



Le cottonnier, le sélectionneur, l'entomologiste et la place du coton Bt dans cette histoire

P. J. Silvie

IRD/CIRAD

SupAgro 3 Novembre 2011

Module Biotechnologies

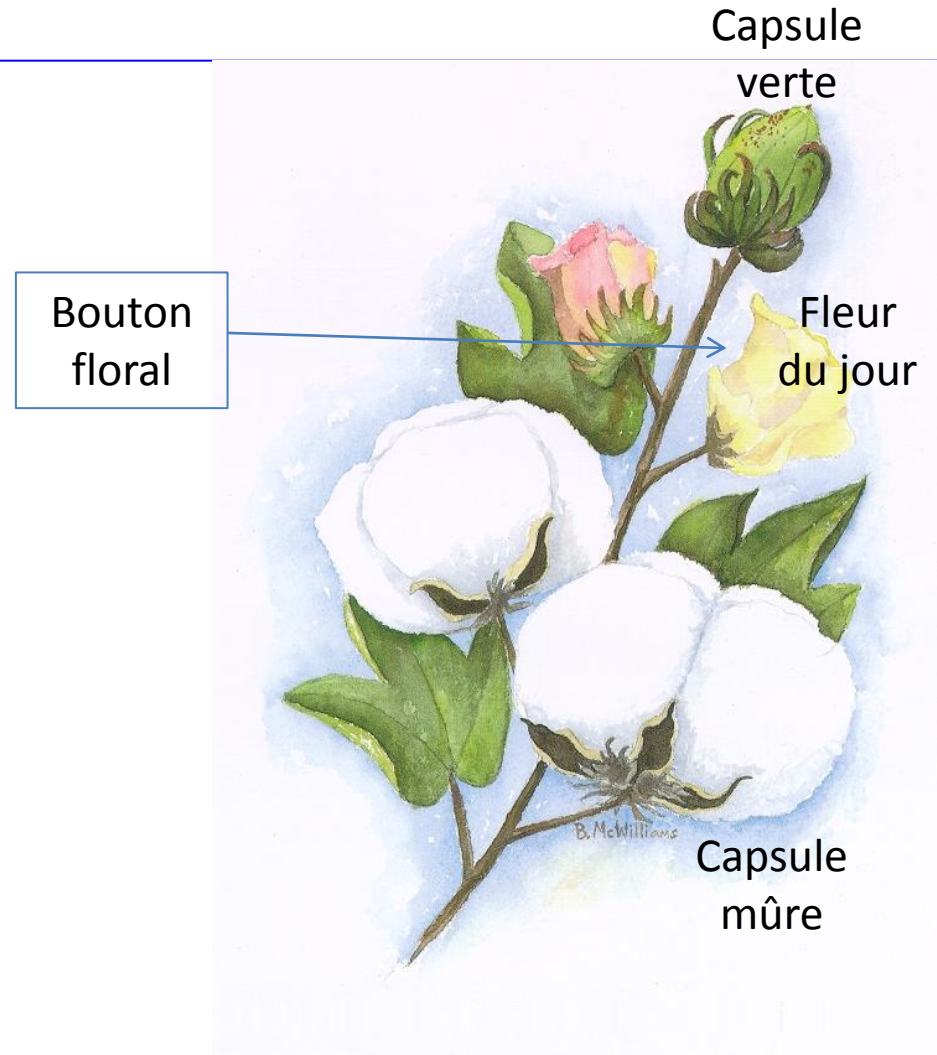
Spécialisation « Amélioration des plantes
méditerranéennes et tropicales »

Le cotonnier

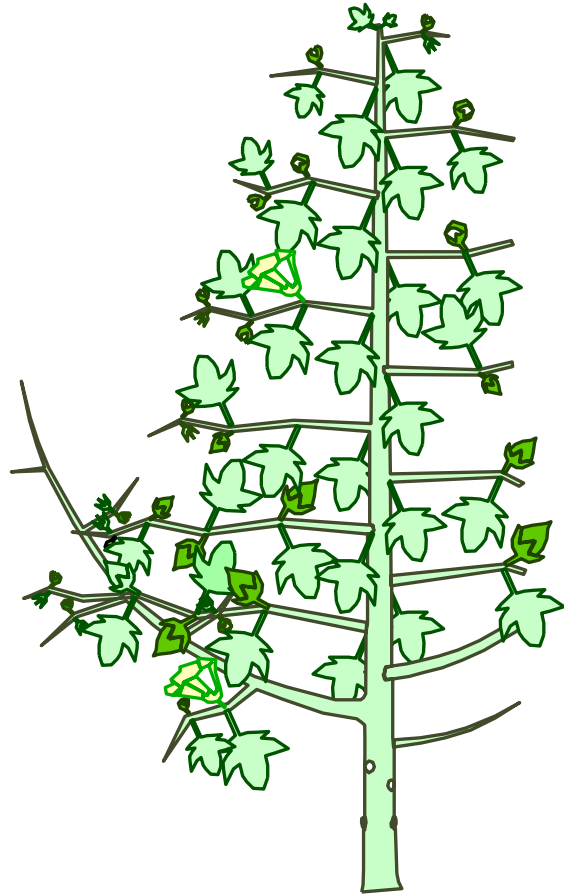
- **Classe : Dicotylédones**
- **famille : Malvacées**
- **genre : *Gossypium* L.**
($x=13$)

🌸 **50 espèces : 45 diploïdes
et 5 tétraploïdes**

⚙️ **8 cytotypes diploïdes
et 1 tétraploïde**



LA PLANTE



- arbuste pérenne à croissance indéterminée
- floraison à 50-60 jours, cycle semis-récolte de 5 à 7 mois
- préférentiellement autogame
- contraintes abiotiques majeures: ensoleillement, température et eau (~750 mm)
- dégâts importants par les insectes et maladies
- des systèmes de production très variés (pluvial/irrigué, +/- intensif, récolte manuelle/ mécanisée)

Cultivé principalement pour la fibre



Coton-graine =
graine + fibre

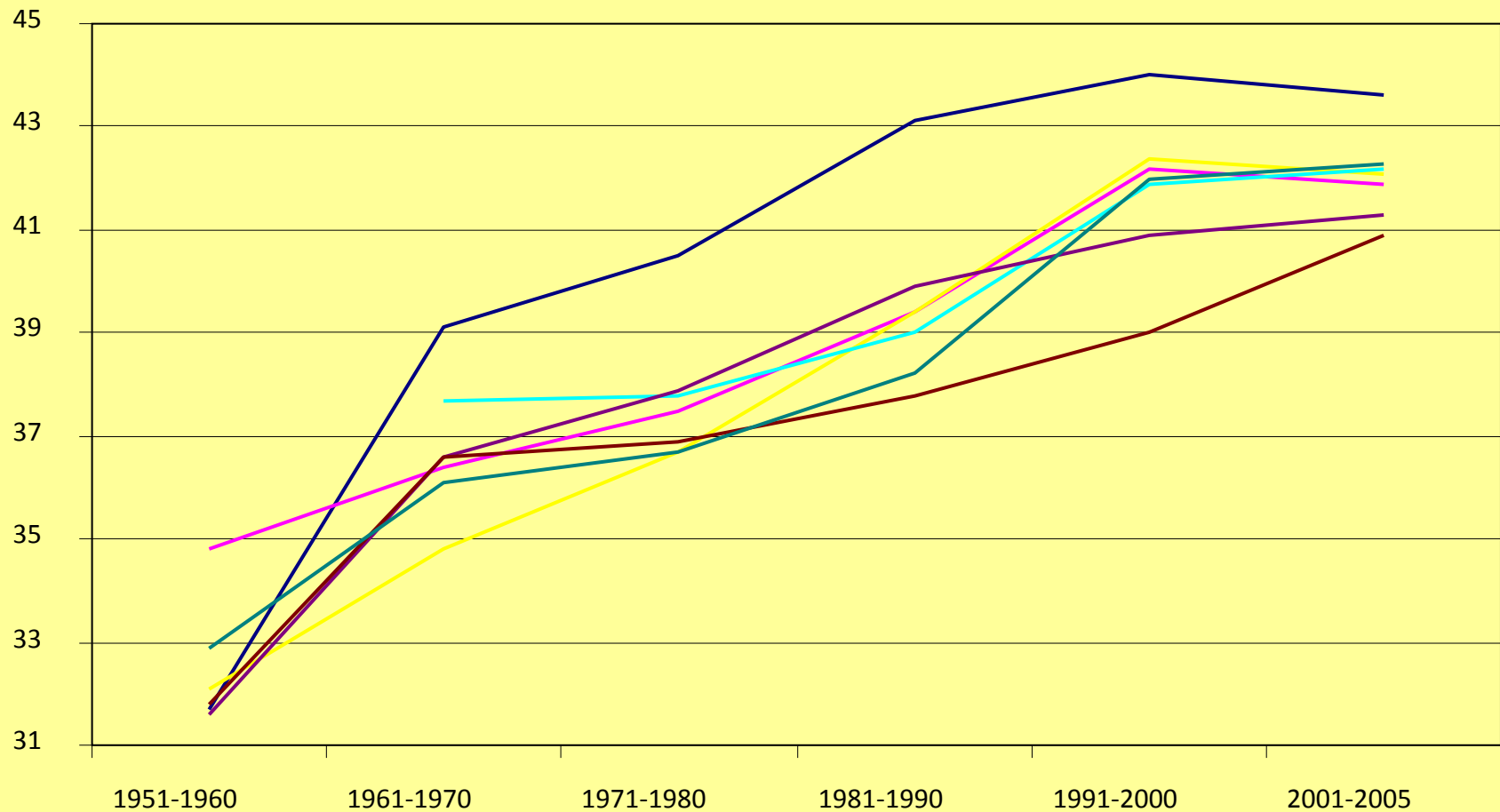
COMPARAISON DES ESPÈCES CULTIVÉES

Espèces	hauteur Plant cm	% fibre	long. mm	résis- tance	dia- mètre	fines se
<i>herbaceum</i>	76	30.9	21.2	18.7	5.3	<u>375</u>
<i>arboreum</i>	70	30.7	21.5	21.3	<u>6.5</u>	314
<i>barbadense</i>	<u>124</u>	33.7	<u>33.3</u>	<u>35.5</u>	4.2	204
<i>hirsutum</i>	103	<u>37.8</u>	29.1	29.2	4.2	216



Source: D. Dessauw Cirad-valorisation

RENDEMENT ÉGRENAGE (% fibre)



— Côte d'Ivoire

— Mali

— Burkina Faso

— Bénin

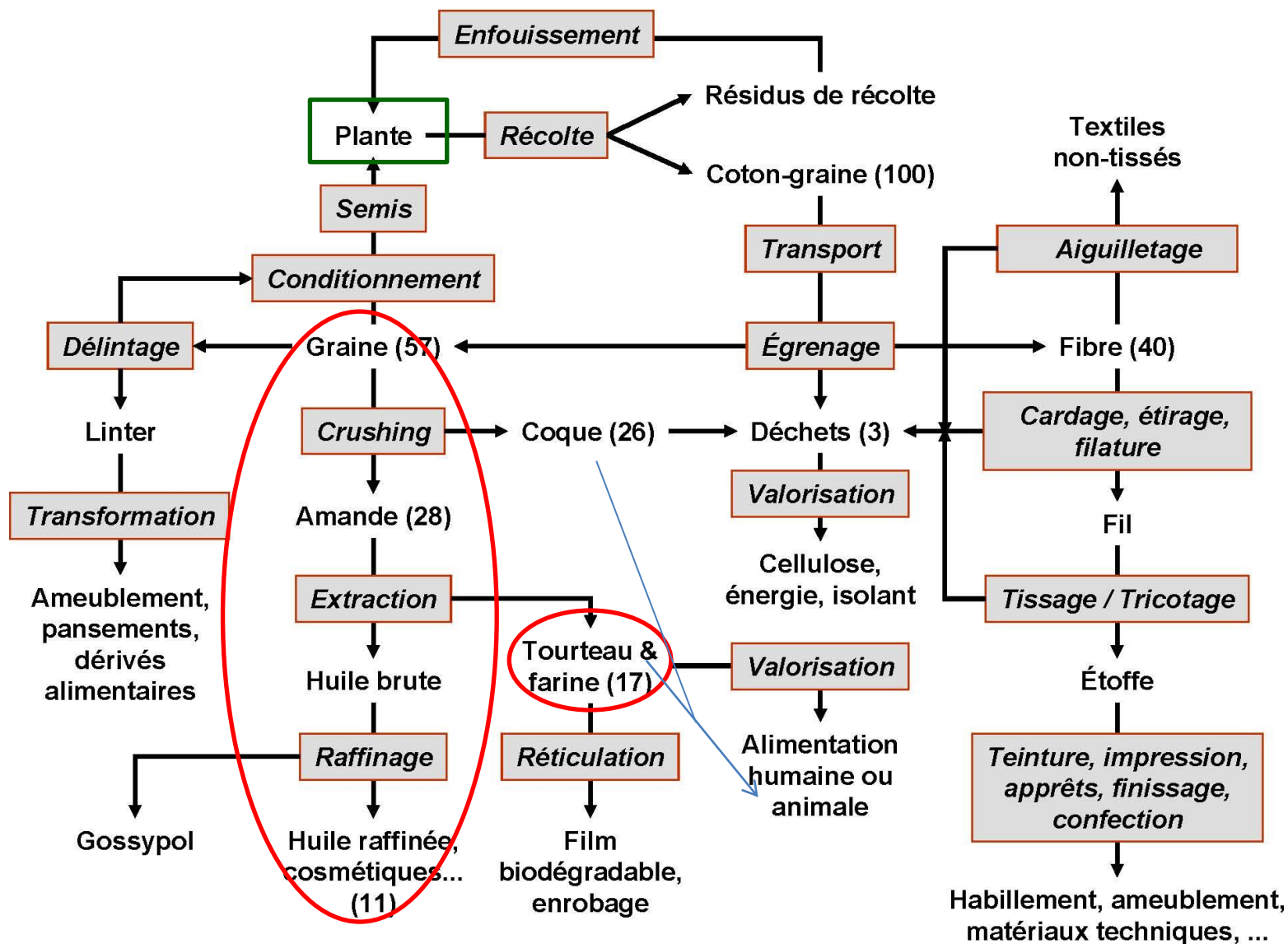
— Cameroun

— Tchad

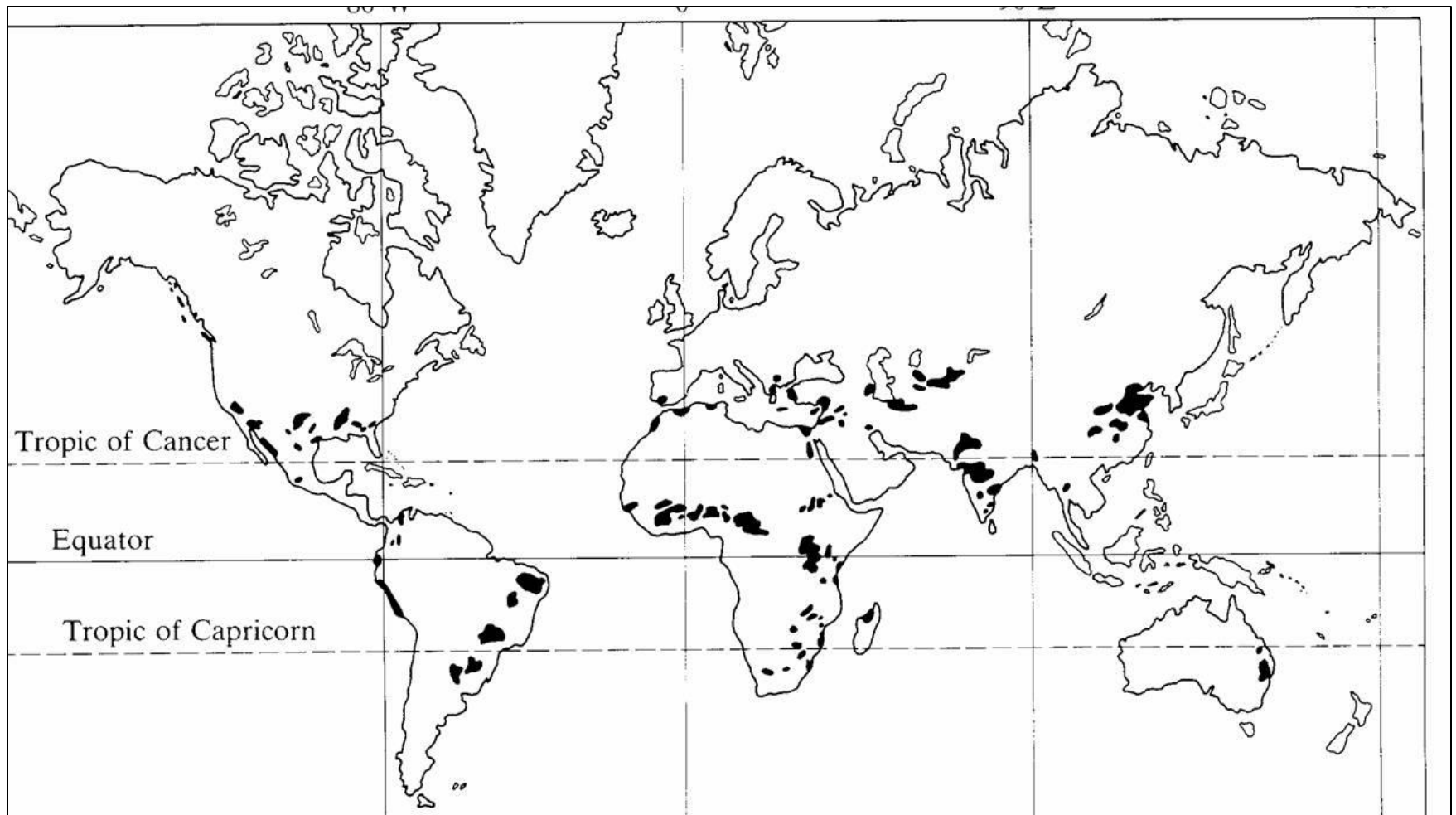
— RCA

Source: D. Dessauw
Cirad-valorisation

Des 'sous-produits' sont valorisés



Régions de production du coton



Donc, des systèmes de culture diversifiés...(70 pays producteurs)

Des systèmes de culture diversifiés...



3-6 applications insecticides/cycle cultural

1000 kg coton-graine/ha



Monoculture à grande échelle

15-20 applications/cycle cultural

3000 kg coton-graine/ha

Des systèmes de culture diversifiés...



Le cotonnier est cultivé par de petits producteurs (agriculture familiale) ou de grands exploitants (entreprise agricole)

Ils n'ont pas les mêmes contraintes



La majorité (53%) de la culture dans le monde est conduite en irrigation



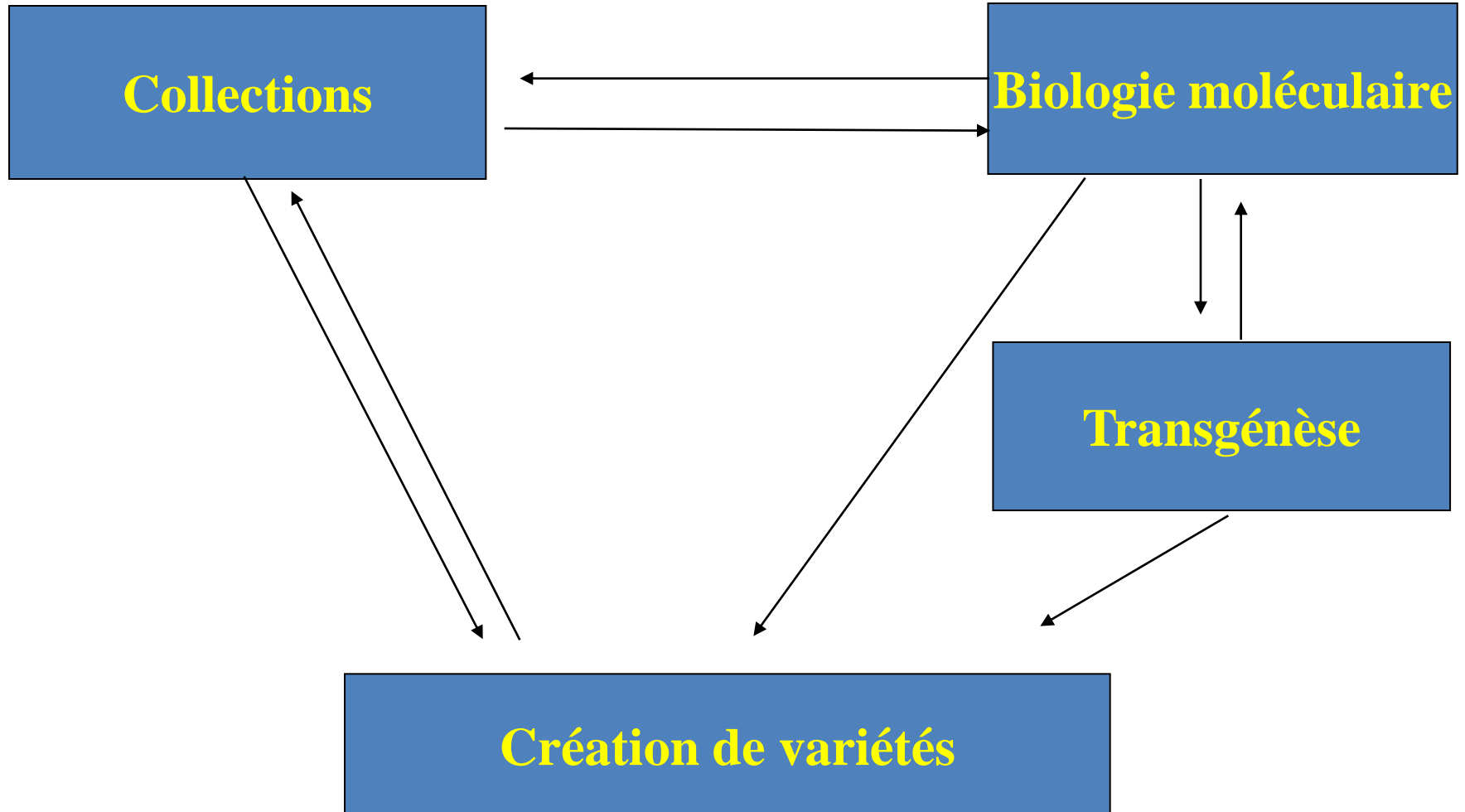
Gestion d'un facteur limitant : l'eau !

Le sélectionneur



Jean-Louis Bélot (CIRAD) regardant les racines d'une culture à haute densité de cotonniers (Mato Grosso, Brésil)

STRATÉGIE : utiliser les outils disponibles



Les critères de sélection sont multiples

Le cotonnier subit la concurrence de **Mauvaises herbes**, et l'action d'autres **bio-agresseurs** qui provoquent des dégâts et des pertes quantitatives et qualitatives

Maladies

champignons
bactéries
virus



Ravageurs

Nématodes
Myriapodes
Acariens
Insectes



La « maladie bleue »



Plants manquants

Plants nains



La « maladie bleue »



Plants nains



Les critères de sélection sont multiples



Longueur des racines



Effet de la compaction du sol sur les racines

Les critères de sélection sont multiples



Cotonnier de type
« cluster »



Cotonnier avec une production moins regroupée

Architecture de la plante (en prévision de la récolte)

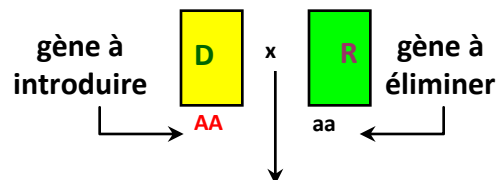
MÉTHODES DE SÉLECTION

- Sélection généalogique
- (Sélection massale pedigree)
- Sélection back-cross
- Croisements interspécifiques
- *SAM (outil)*
- *Transformation génétique (outil)*

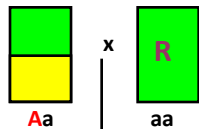
SÉLECTION GÉNÉALOGIQUE

Année	Génération		Taille (par exemple)			
			cultivé		sélectionné	
			plante	lignée	plante	lignée
1994	Croisement					
1995	F1		50		50	
1996	F2		5000		250	
1997	F3			250	125 dans 50	
1998	F4			125	90 dans 40	
1999	F5			90	80 dans 35	
2000	F6			80		15
2001	F7			15		4
2002	F8			4		1
2003-2004	F9-F10			1		

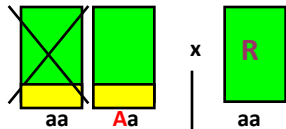
Source: D. Dessauw
Cirad-valorisation



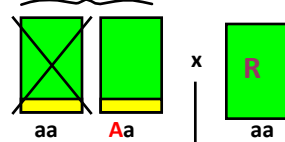
croisement initial



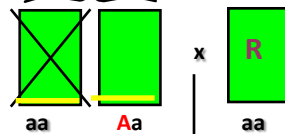
1^{er} rétrocroisement
= backcross 1 = BC 1



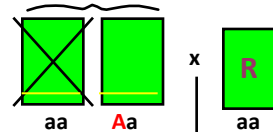
BC 2



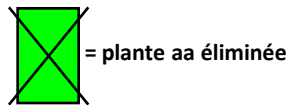
BC 3



BC 4



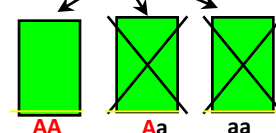
BC 5



résultats du BC 5

R(AA) ← sélection généalogique

autofécondation



SÉLECTION

BACK CROSS

SAM (QUALITÉ DE FIBRE)

Backcross assistés par marqueurs :

3 grandes étapes

Carte génétique

26 chr., 1276 loci (SSR, AFLP, RFLP, candidats), 5700 cM

QTLs

- 80 QTLs pour 11 caractères de qualité
- 19 régions « cibles »

Sélection précoce sur marqueurs

- env.10% plants retenus

Source: D. Dessauw
Cirad-valorisation

G. hirsutum

x

G. barbadense

F1 x *G.hirsutum*

BC1 x *G.hirsutum* (SSD)

BC2 x *G.hirsutum*

BC2S1

BC3 x *G.hirsutum*

BC4 x *G.hirsutum*

BC4S1

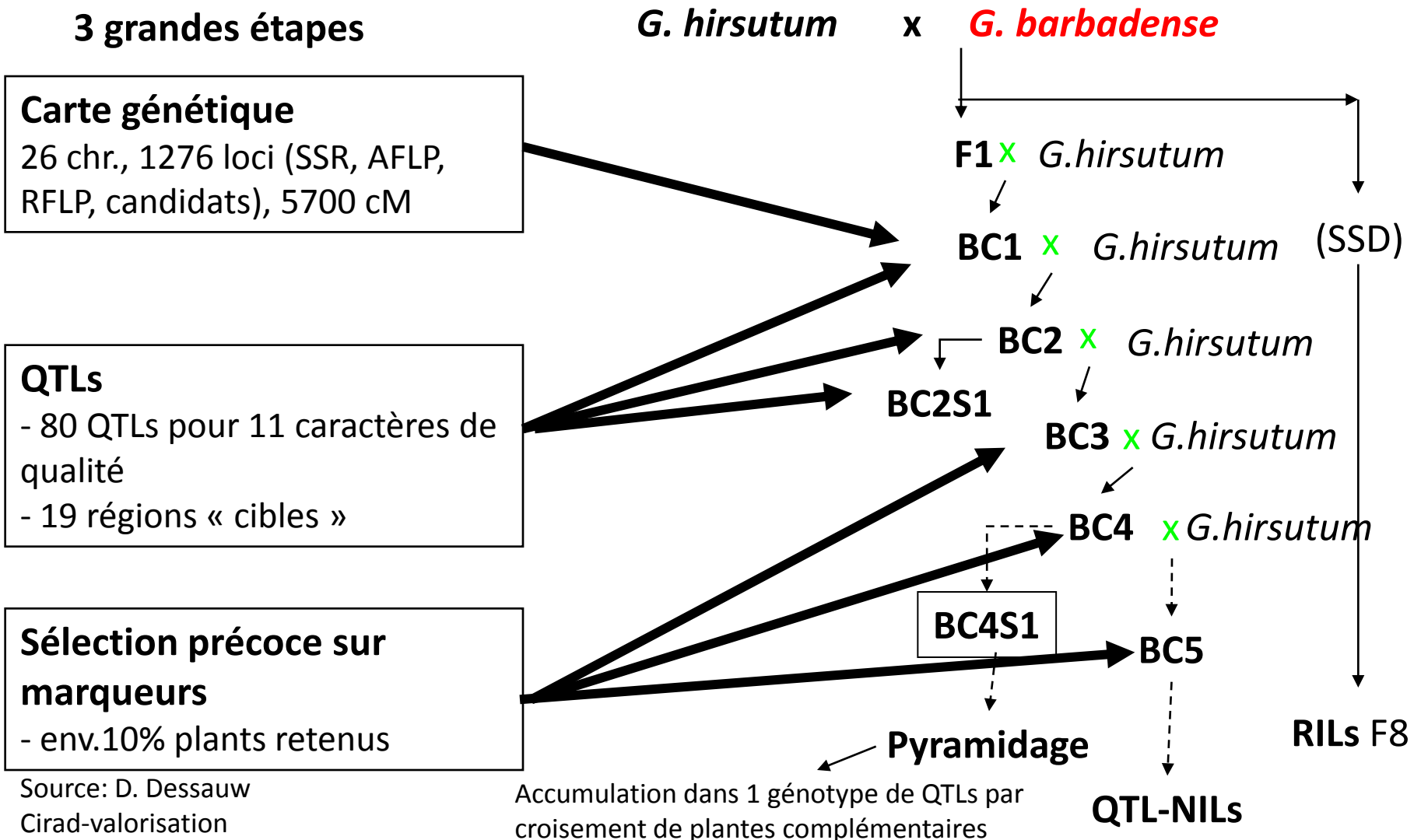
BC5

RILs F8

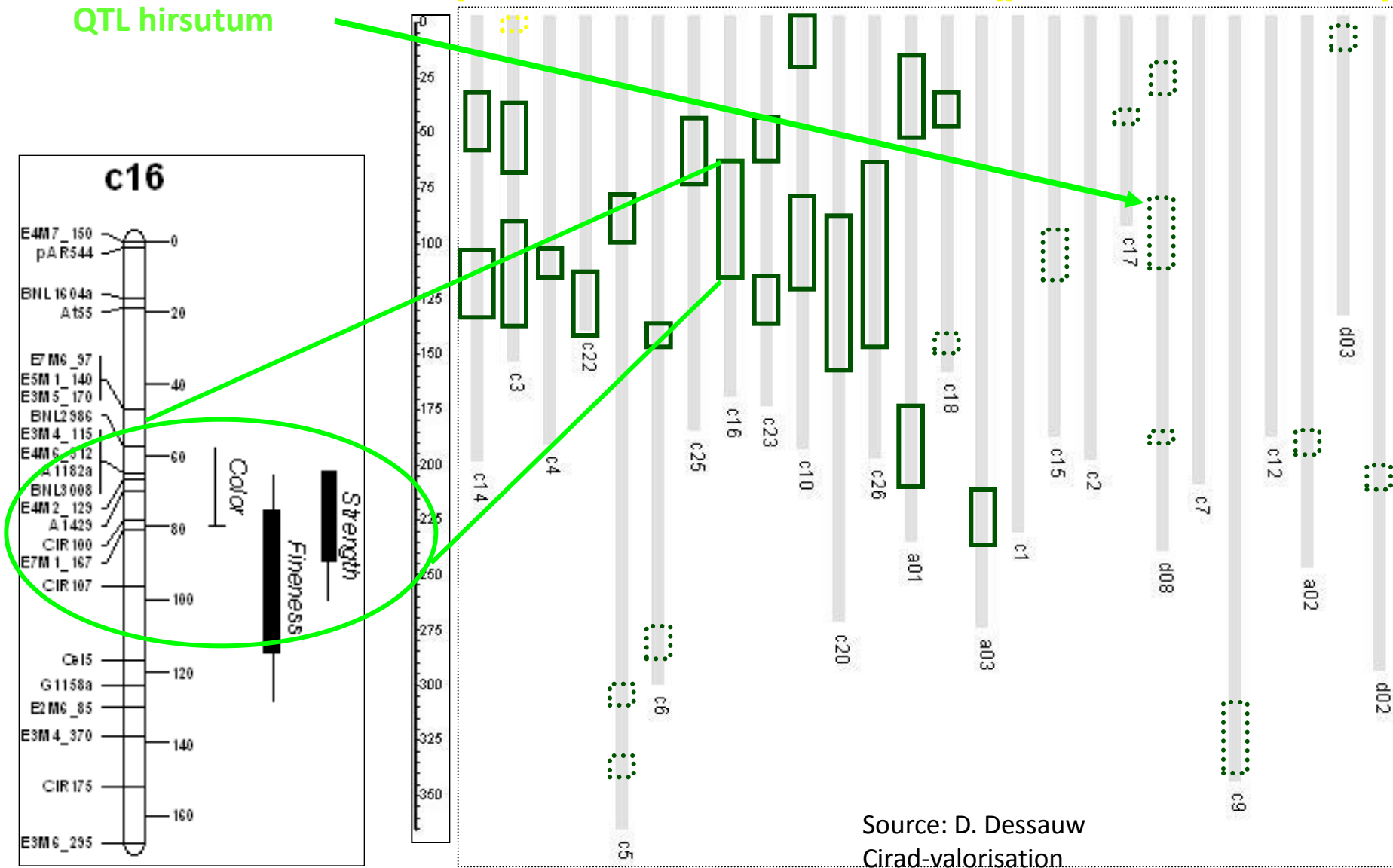
Pyramidage

QTL-NILs

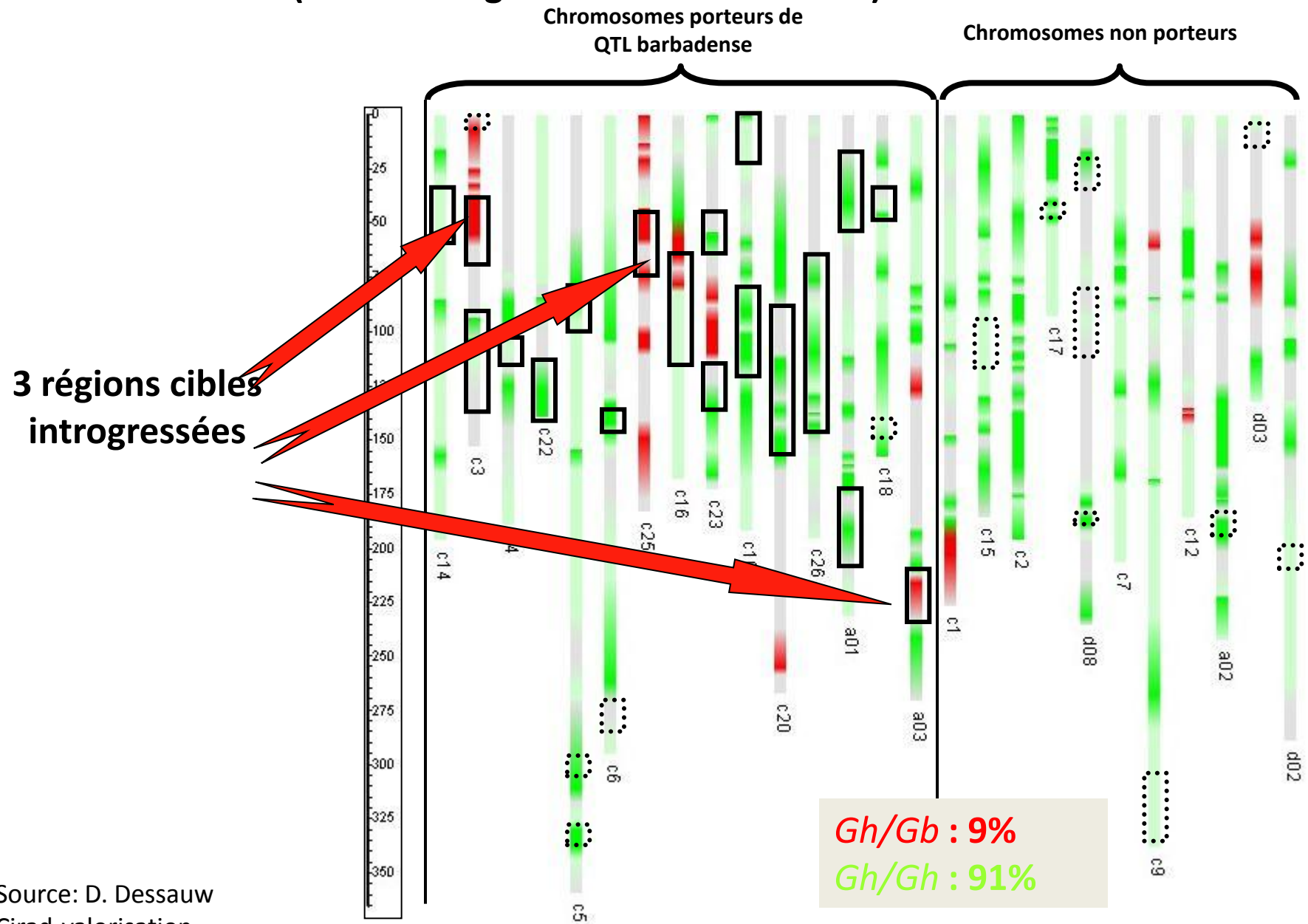
Accumulation dans 1 génotype de QTLs par croisement de plantes complémentaires



Des régions chromosomiques « porteuses » de QTL de *G. barbadense* servent de « cibles »

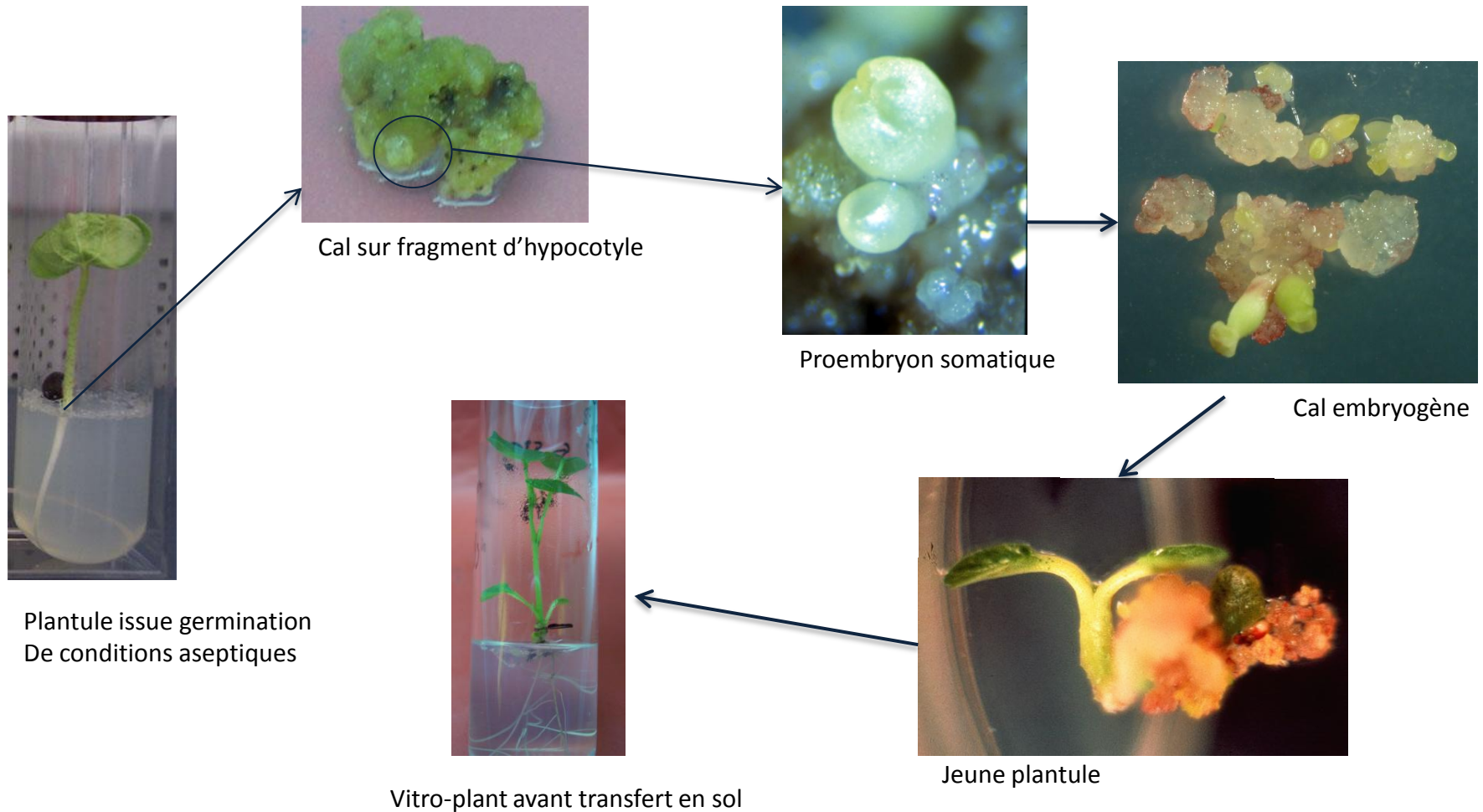


Exemple de « génotype graphique » d'1 plante après 4 BC sur le parent receveur *G. hirsutum* (zones introgressées *G. barbadense*)



Le transfert de gènes dans le génome du cotonnier

Étape 1: régénération *in vitro* par embryogenèse somatique



Le transfert de gènes dans le génome du cotonnier

Étape 1: régénération *in vitro* par embryogenèse somatique

Étape 2: transfert de transgènes *via Agrobacterium tumefaciens*

- Inoculation des fragments d'hypocotyle avec la souche d'A.t



- Développement sur milieu sélectif de cals à partir des cellules transformées



- Obtention de souches embryogènes transformées



- Transformants primaires (T0)



- Obtention des graines T1



Limites et voies d'améliorations de la méthode

- **Les limites de la méthode:**

- Peu de génotypes efficacement régénérés *in vitro* (back crosses nécessaires pour transfert dans des variétés intéressantes)
- Processus relativement long (7-9 mois pour transfert en sol des T0)
- Efficacité moyenne = 5% de taux de transformation (calculé par rapport au nombre d'explants mis en culture)
 - Dépend du matériel végétal
 - De la souche d'*Agrobacterium*
 - De la structure de la construction portant le gène d'intérêt
 - De la nature du gène d'intérêt

- **Les voies d'amélioration:**

- Réduire la variabilité de réponse du matériel végétal: sélection de matériel « compétent » pour l'embryogenèse somatique
- Développer une méthode de transfert dans les tissus embryogènes
- Identifier les gènes impliqués dans le processus d'embryogenèse somatique

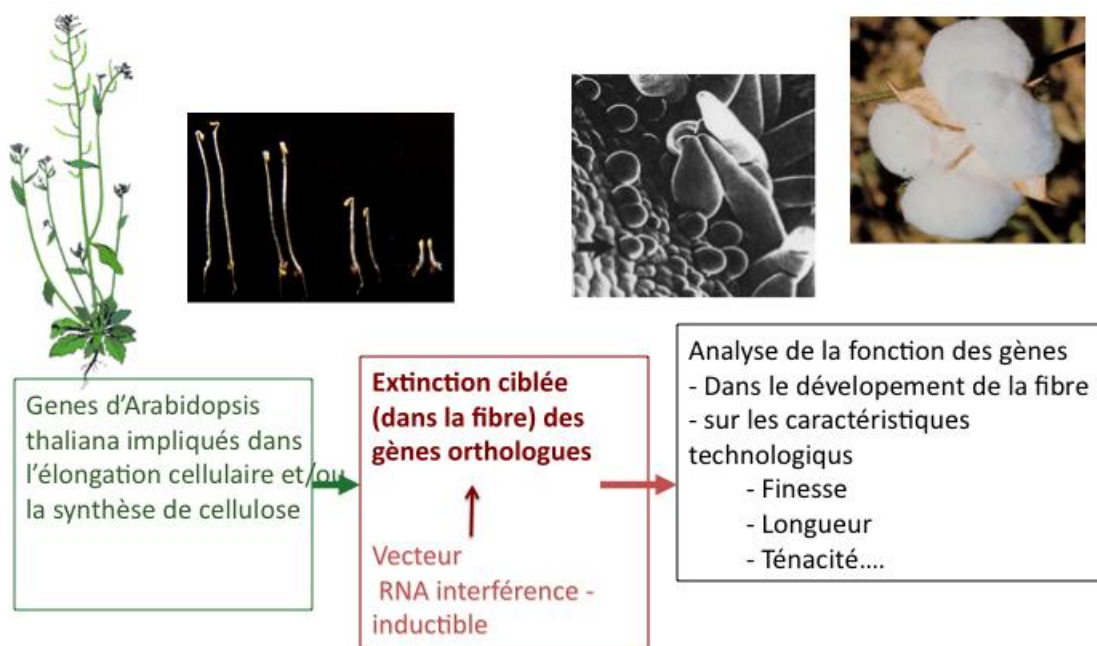
Les recherches en cours (au Cirad)

- **Création variétale**

- Résistance aux insectes (essentiellement Bt)
- Résistance aux herbicides
- *Tolérance à la sécheresse*
- *Economie d'intrants (meilleure efficacité de l'utilisation de l'azote)*

- **Génomique fonctionnelle**

Exemple: Développement et caractéristiques de la fibre de coton



L'entomologiste



Son domaine d'intérêt: certains bio-agresseurs

Maladies

champignons

bactéries

virus

Ravageurs

Nématodes

Myriapodes

Acariens

Insectes

Virus



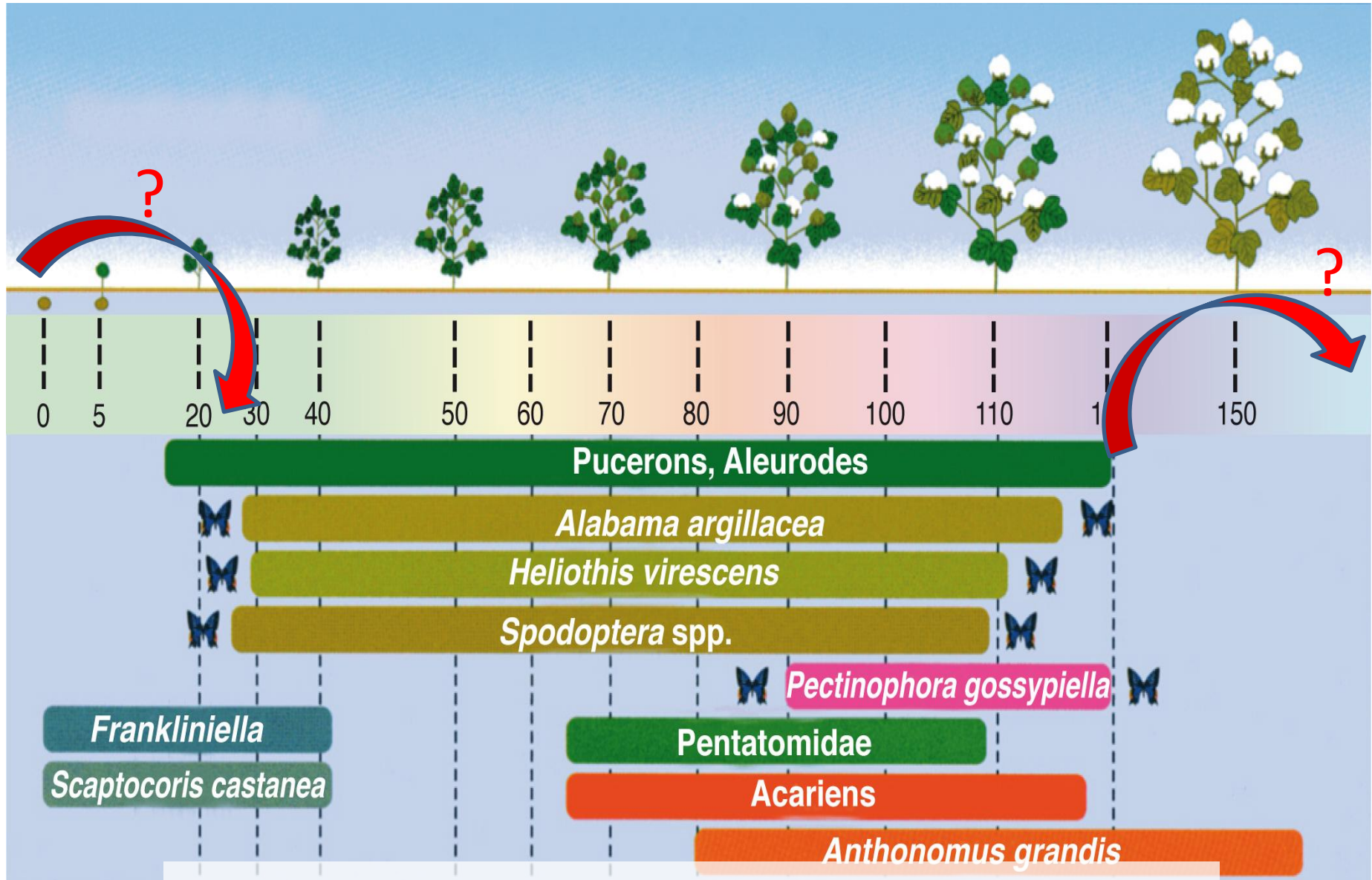
Les acariens et insectes: qui sont-ils ?



Les insectes: qui sont-ils ?

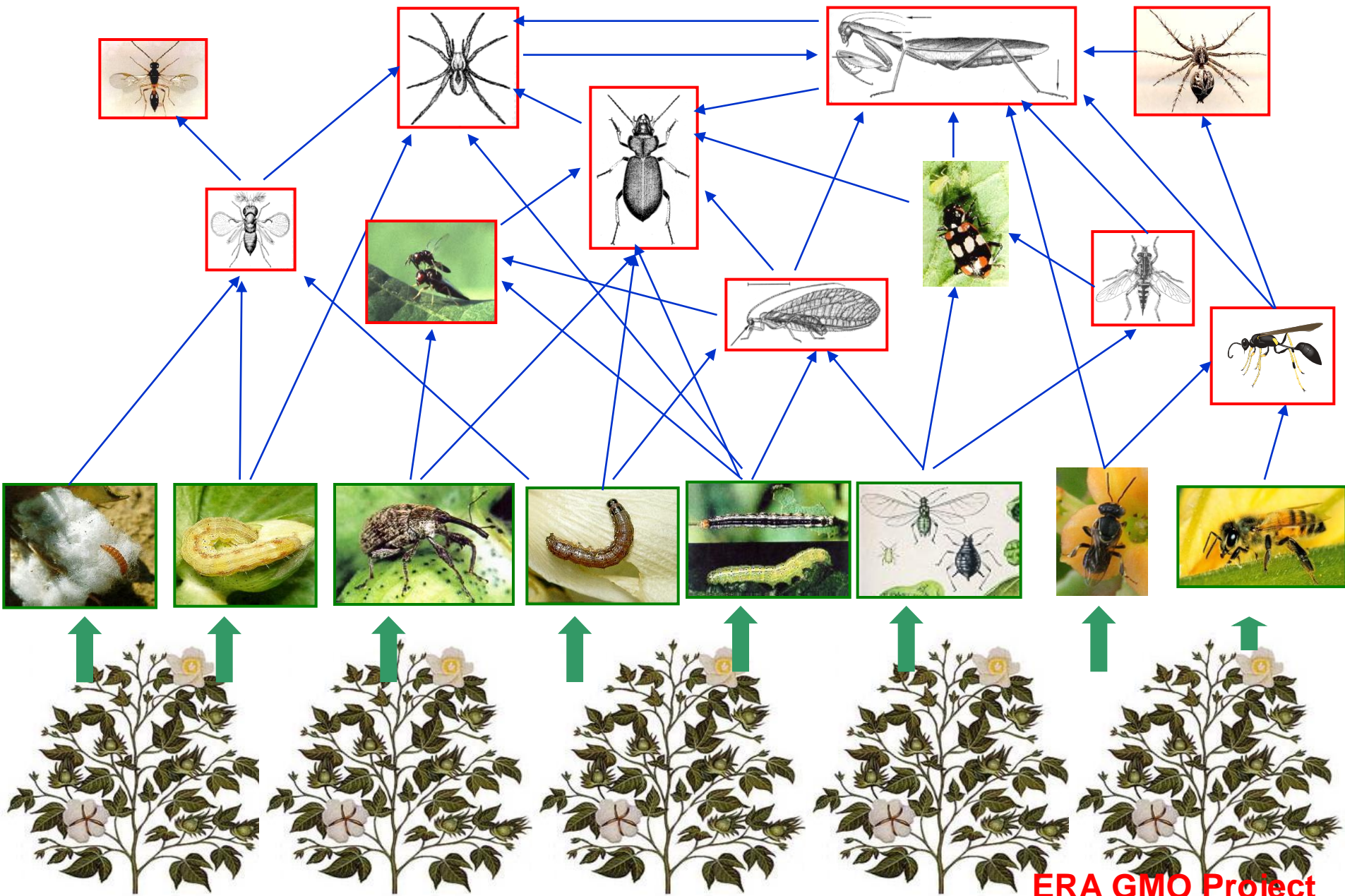


Les acariens et insectes: d'où viennent-ils ?



et où vont-ils, en dehors du cotonnier ?

Un réseau trophique complexe



Une régulation naturelle souvent tardive: ennemis naturels



Quelle importance économique ?

Non traité



Traité



TOGO

Quelle importance économique ?

Dégâts d'anthronome (*A. grandis*, Curculionidae)

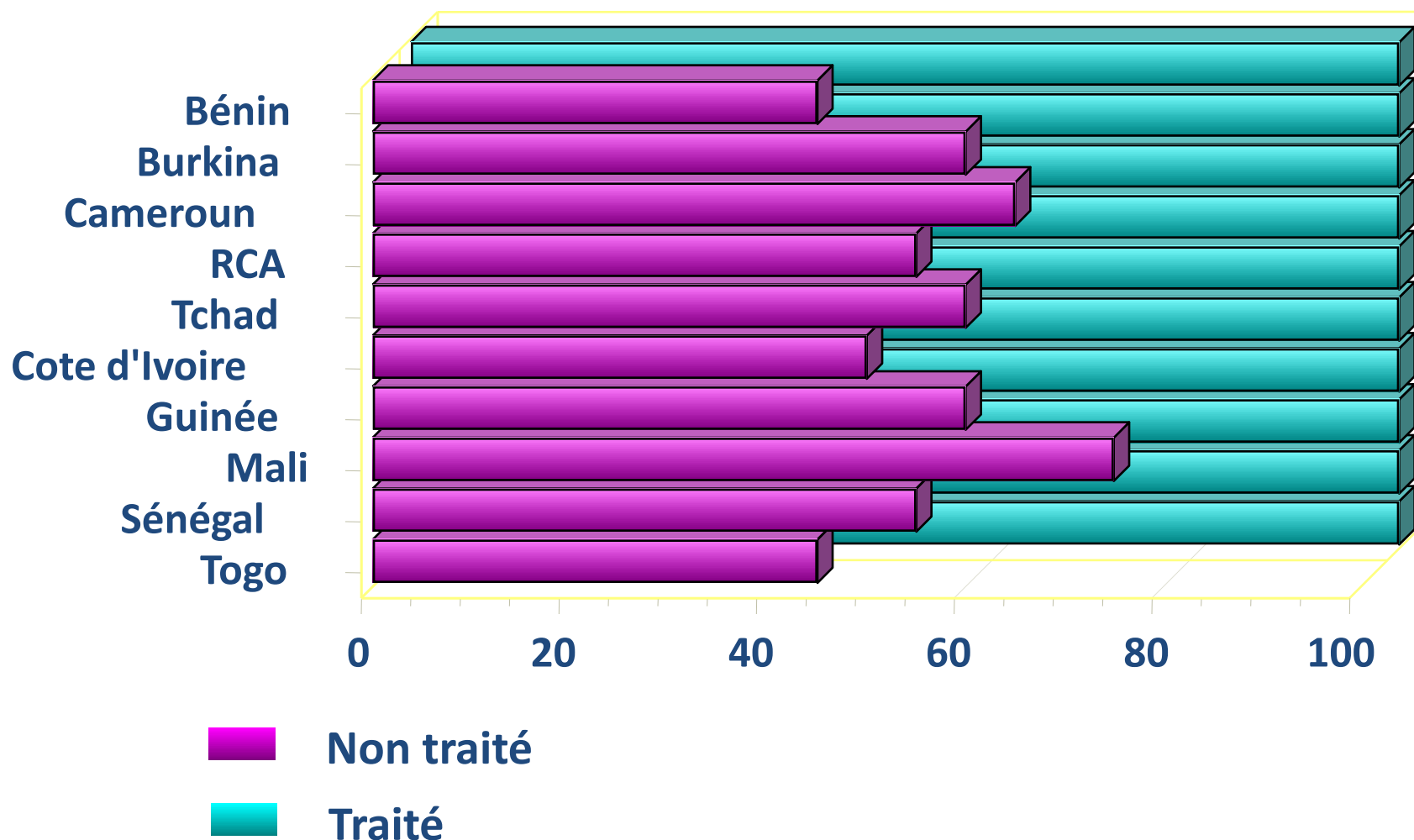


Source: W. J. dos Santos, IAPAR

BRÉSIL

Pertes de production de coton-graine en Afrique subsaharienne

production de Coton-graine (en % du potentiel)



Les acariens et insectes: comment les combattre ?

- Efficacement
- Économiquement
- Écologiquement

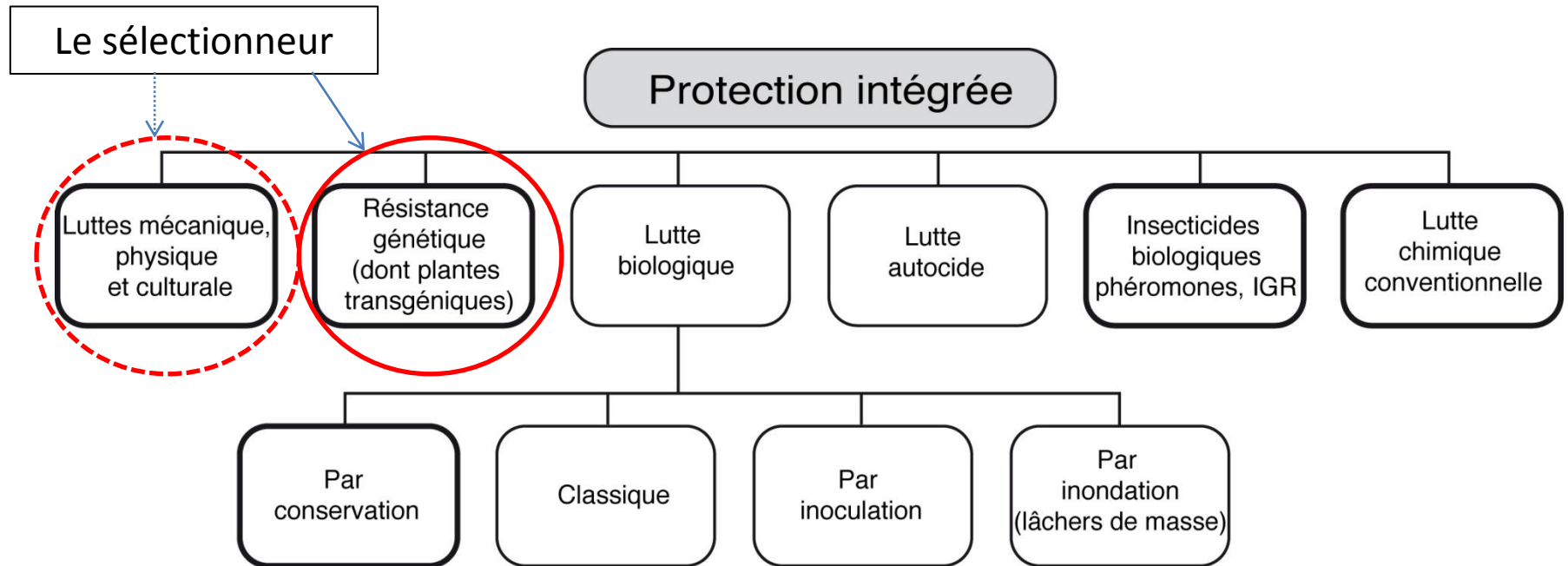
...Sans négliger les aspects sociologiques



Le paradigme de l'IPM

IPM = Integrated Pest Management

« Technologies » disponibles pour le management des ravageurs

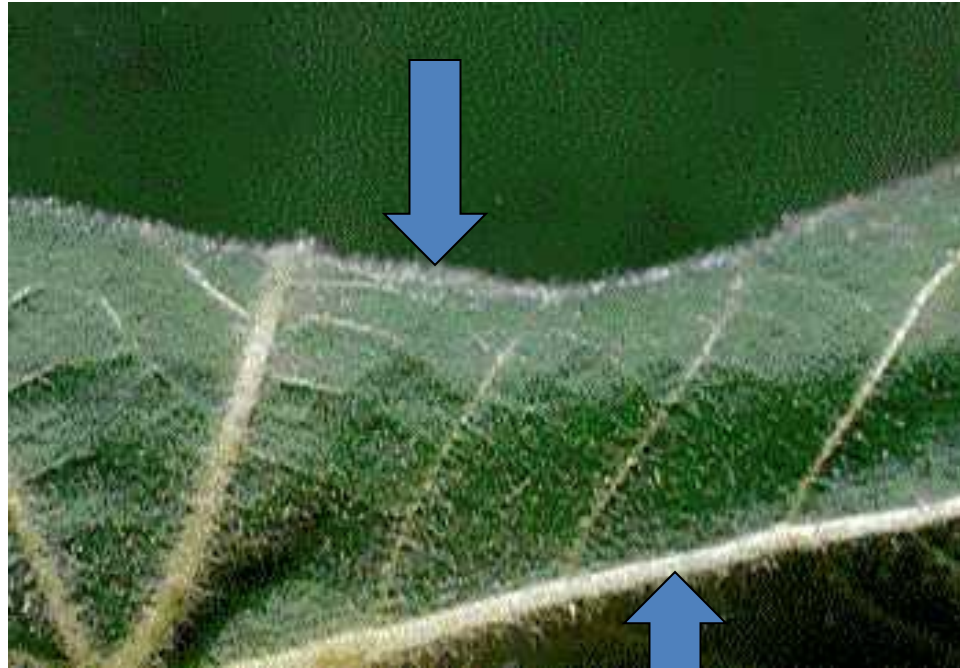


(source : Eilenberg *et al.*, 2001, traduit)

Quelques caractères de résistance variétale aux ravageurs

Résistance aux ravageurs

- Des obstacles morphologiques
 - La Pilosité



- Des barrières chimiques
 - Gossypol

Les feuilles 'okra'

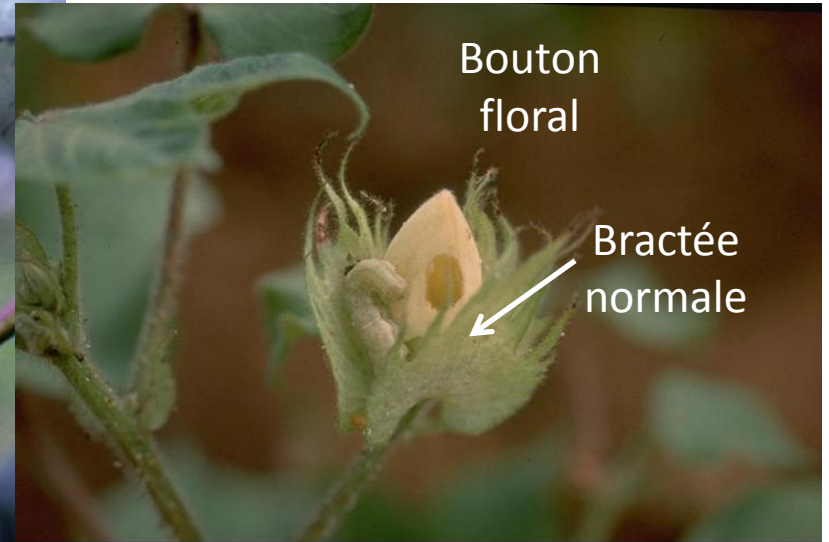


Variétés utilisées en Australie

Facilite la pénétration de
l'insecticide...et de la lumière !



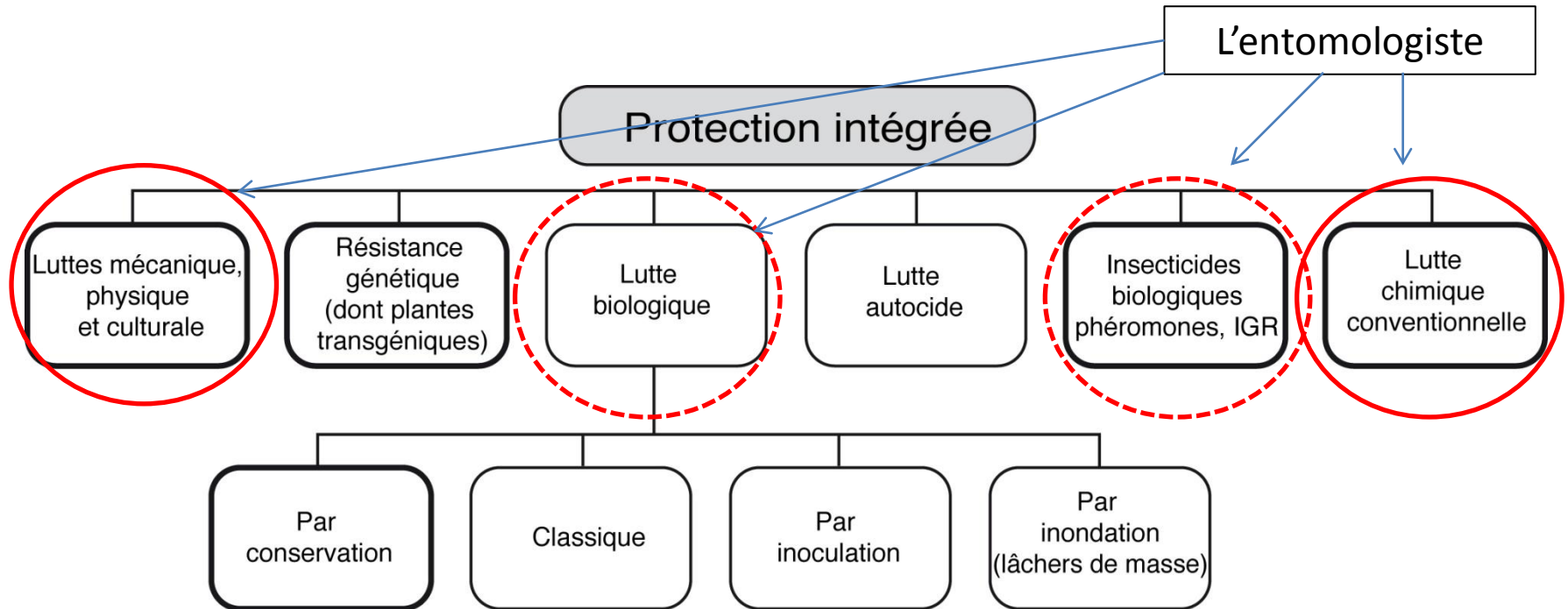
Bractées 'frego'



Facilite la
pénétration de
l'insecticide...mais
réduit le poids
capsulaire !

IPM = Integrated Pest Management

« Technologies » disponibles pour le management des ravageurs



(source : Eilenberg *et al.*, 2001, traduit)

Protection du cotonnier: lutte chimique...



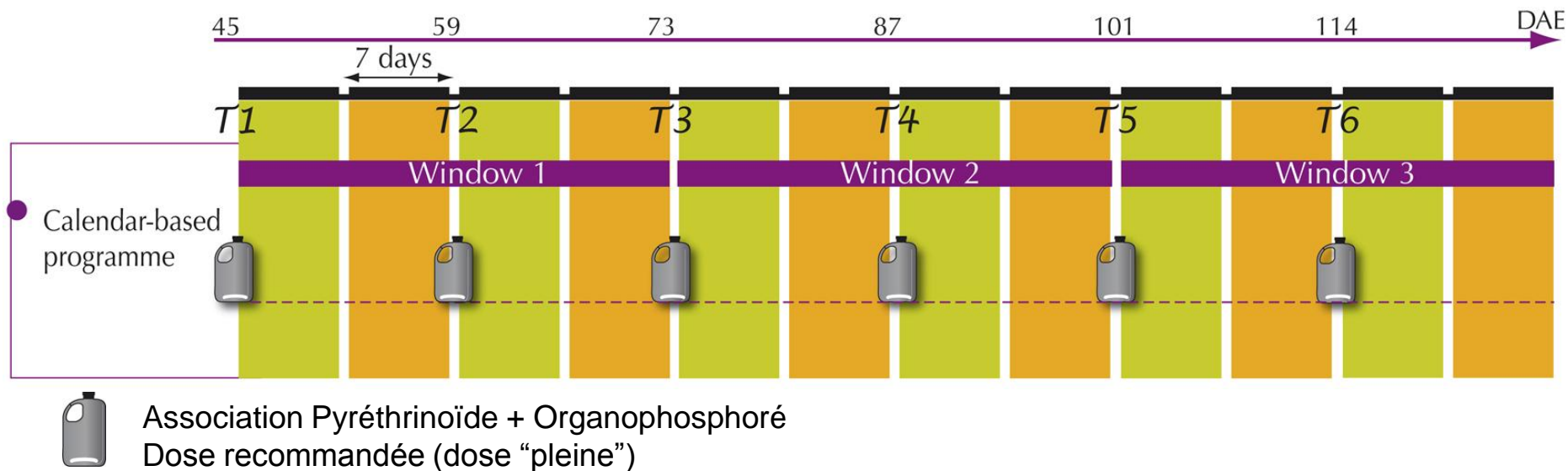
**80 -120 litres
bouillie
insecticide/ha**



1- 10 litres/ha

Programmes sur calendrier pré-établi (Conventionnel)

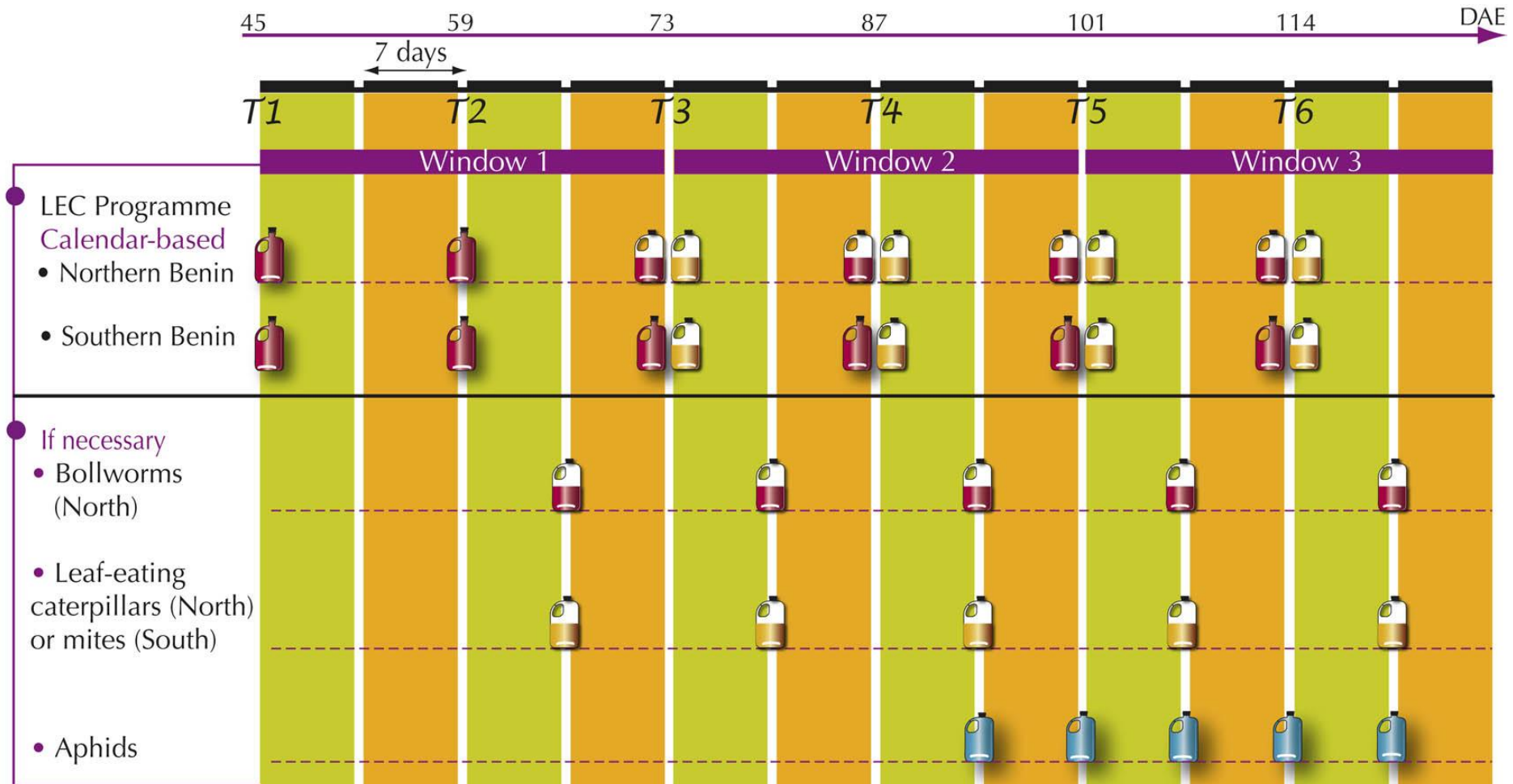
Le nombre d'applications dépend de la date de semis



4 à 7 traitements

Programmes employant des seuils d'intervention

Exemples de programmes de protection en Afrique subsaharienne (Bénin)



Lutte chimique à grande échelle

100 -200 litres/ha


BRÉSIL



20 litres/ha

Lutte chimique à grande échelle

Brésil, Mato Grosso



	Campaign 2006-2007				Campaign 2007-2008	
	Acala 90	DP 90 B	NuOpal	DeltaOpal	DeltaOpal	NuOpal
Número de aplicações	17	19	15	14	27	26
Número total de produtos aplicados	30	24	18	22	41	36
Aplicações aficidas	9	13	5	5	5	5
Aplicações acaricidas	6	7	7	3	3	3
Aplicações moscas brancas	1	2	2	1	0	0
Aplicações lagartas	9	1	1	8	10	6
Aplicações bicudo	5	1	3	3	19	19
Aplicações percevejos	0	0	0	2	0	0

De 15 à 20 traitements, parfois plus, avec de nombreuses matières actives (insecticides, fongicides, herbicides, régulateurs de croissance)

Conséquences sur la santé et l'environnement



Mato Grosso, Brésil



Pollinisateur



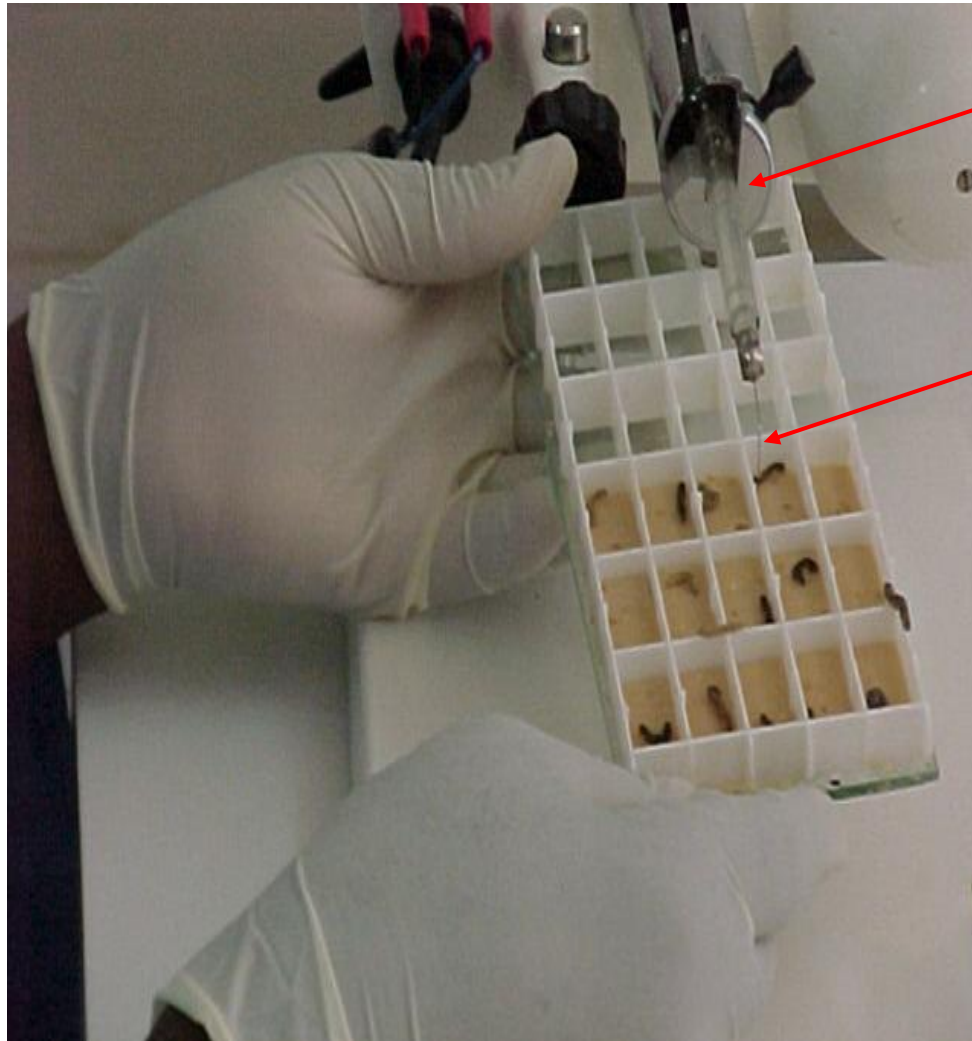
Autre conséquence importante:

résistance aux insecticides

Comment détecter les individus
résistants précocement ?

Mesure de la résistance avec les insecticides

Principe des Doses Létales 50 (DL 50)



Microapplicateur de
Arnold

1 μ l solution déposée
sur chaque chenille

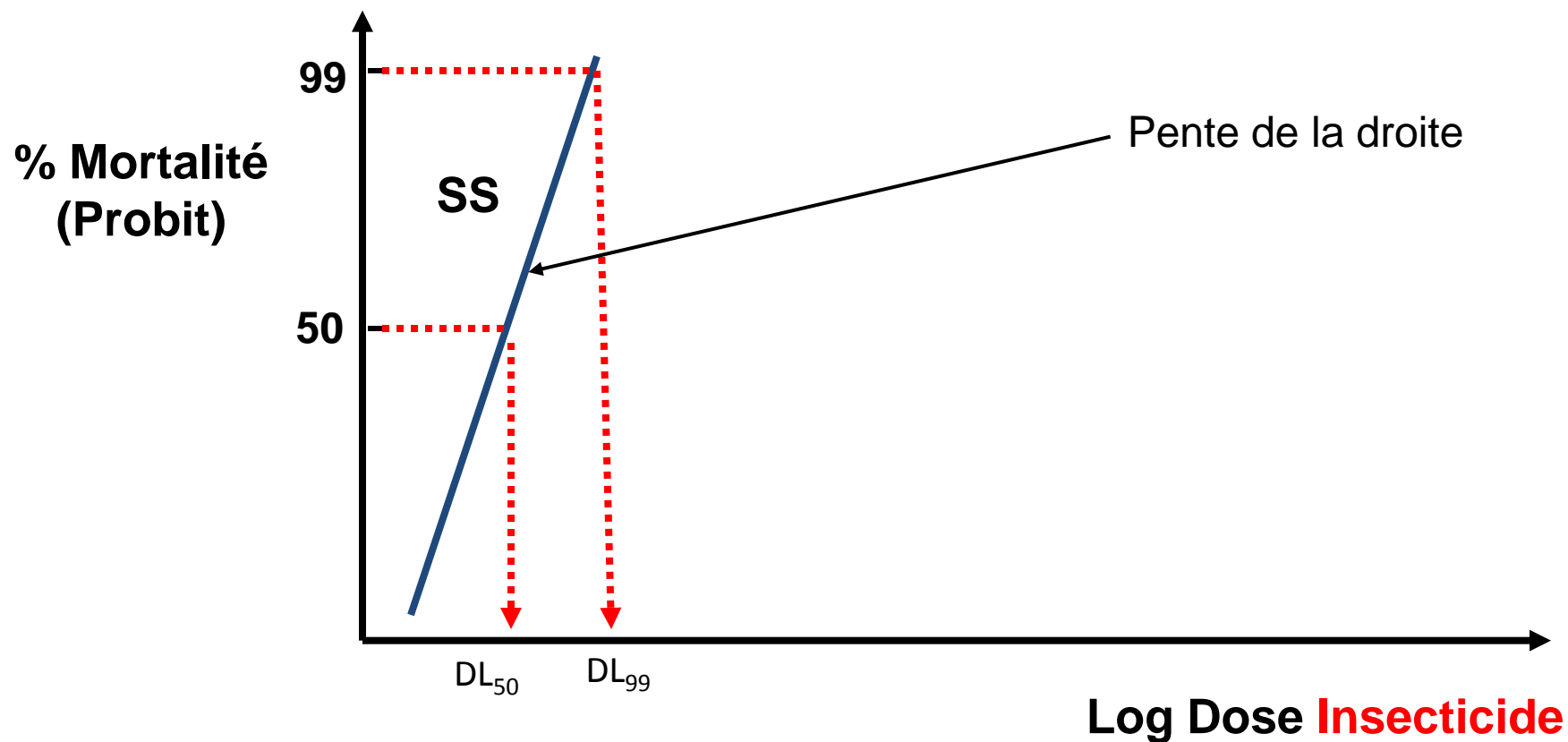


Calcul d'une Mortalité corrigée (formule de Abbott)

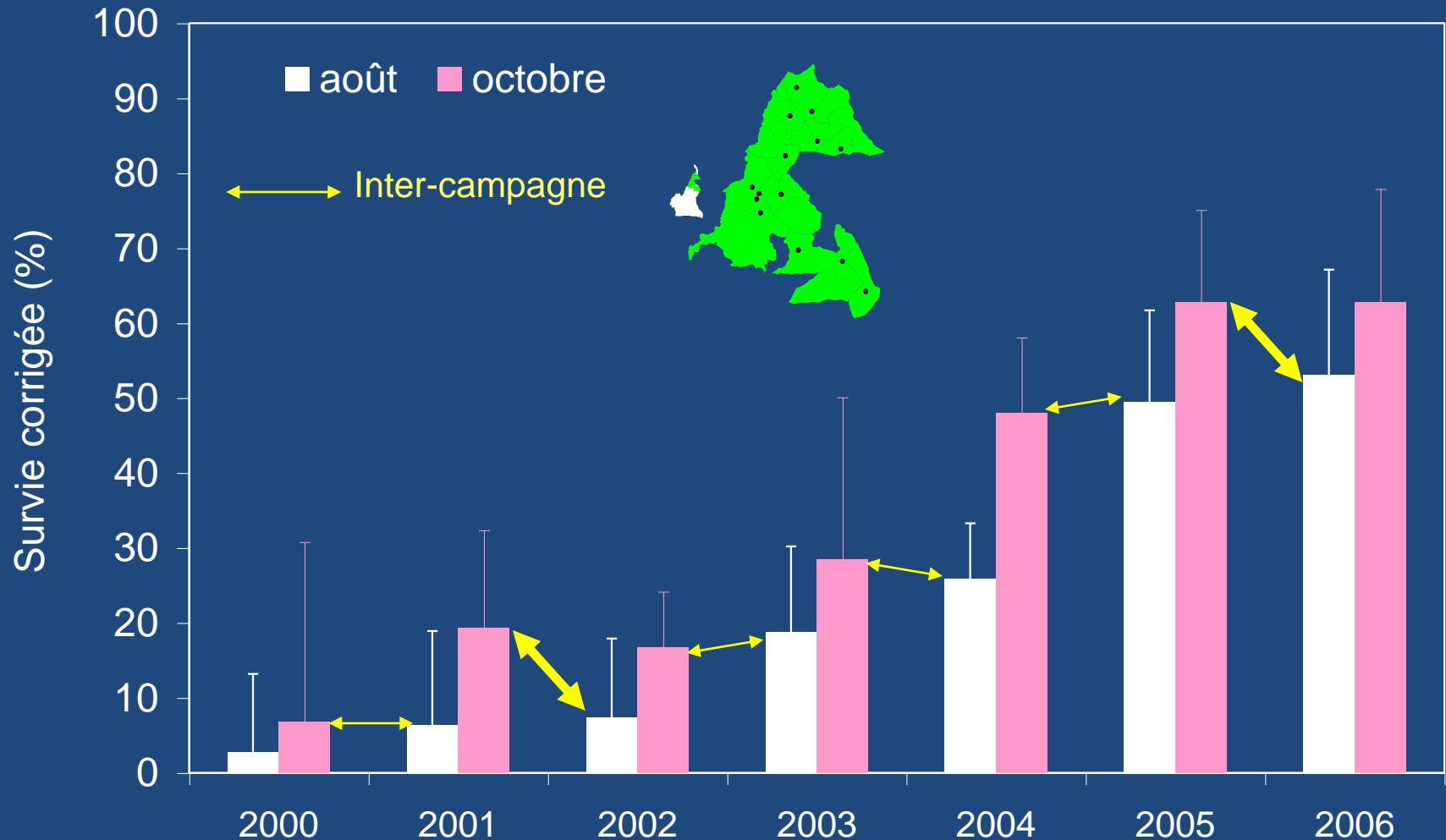
$$\text{Mortalité corrigée (\%)} = \frac{(\% \text{ Mortalité Traité} - \% \text{ Mortalité Témoin}) \times 100}{100 - \% \text{ Mortalité Témoin}}$$

Pour que l'essai soit validé, on estime que la mortalité du lot témoin (non traité) doit être la plus faible possible (idéal = 0 %)

Détermination des DL 50 et DL 99



Résistance des chenilles aux pyréthréinoïdes au Cameroun



Taux de survie à une dose discriminante de cyperméthrine

Une pause ?

Et le coton **Bt** dans cette histoire ?



Essai de comparaison de cotonniers Bt – non-Bt au Paraguay

Pourquoi des cotonniers résistants aux insectes ?

Agallia albidula



Spodoptera spp.



Anthonomus grandis



Pectinophora gossypiella



Spodoptera frugiperda



Dégâts de
Alabama argillacea



Bemisia tabaci



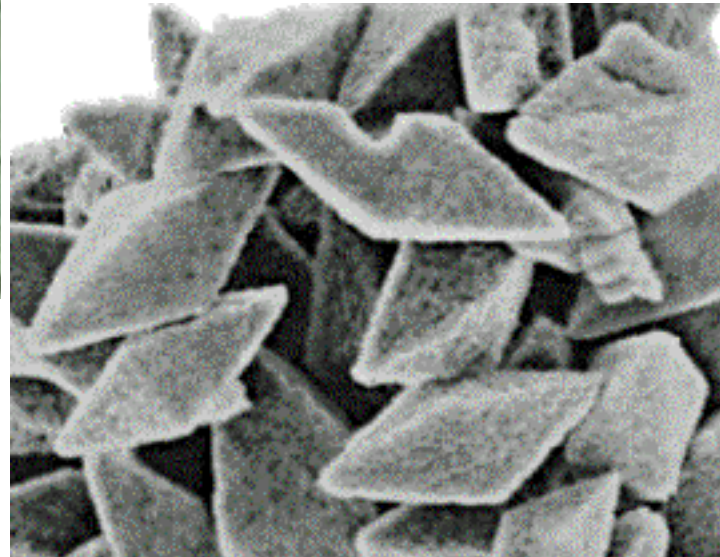
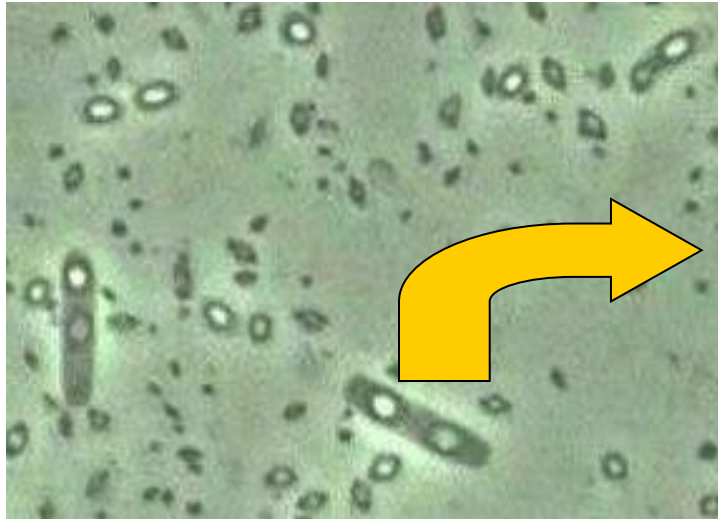
Heliothis virescens



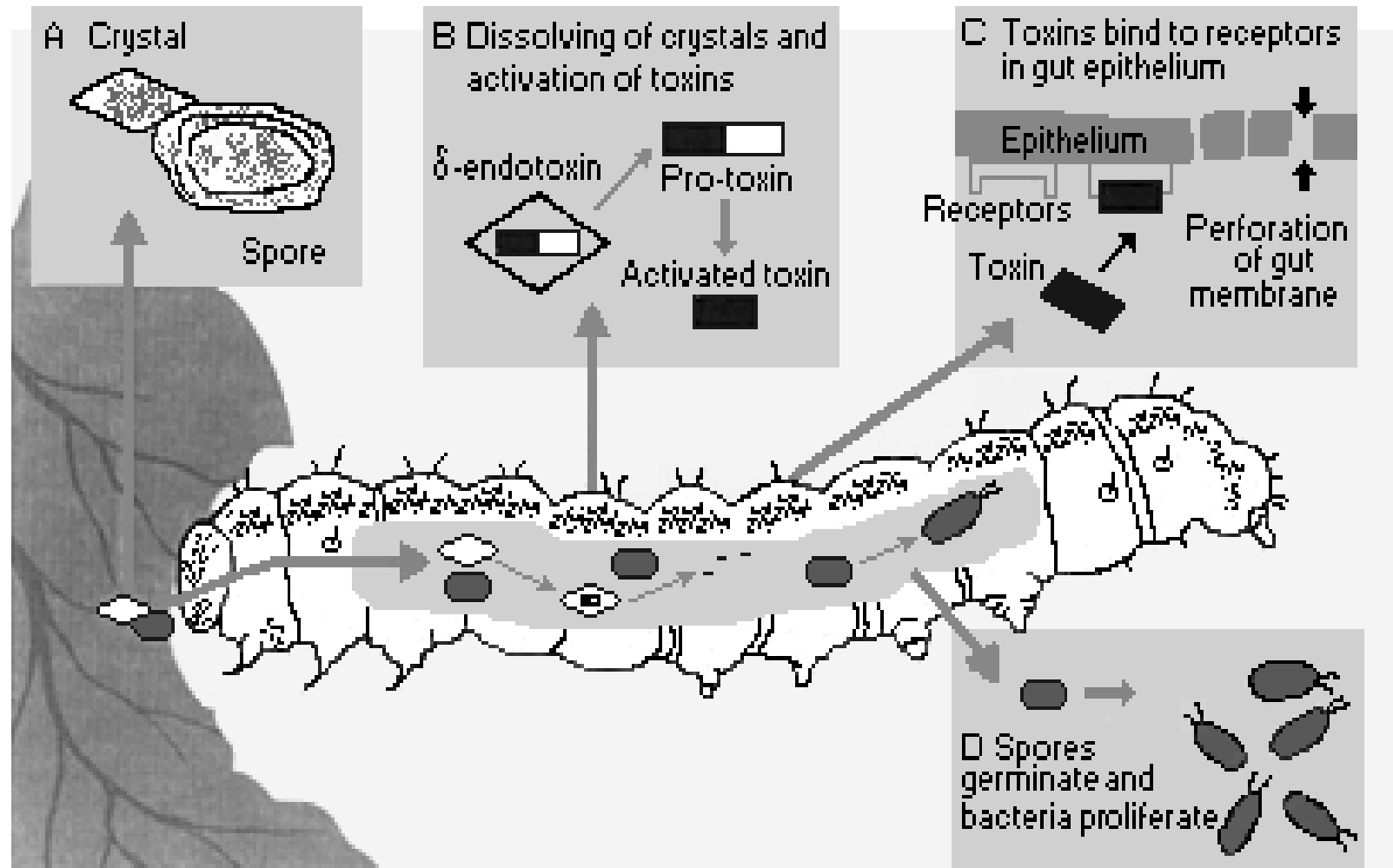
Alabama argillacea

Pourquoi des cotonniers 'Bt' ?

B. thuringiensis et ses toxines

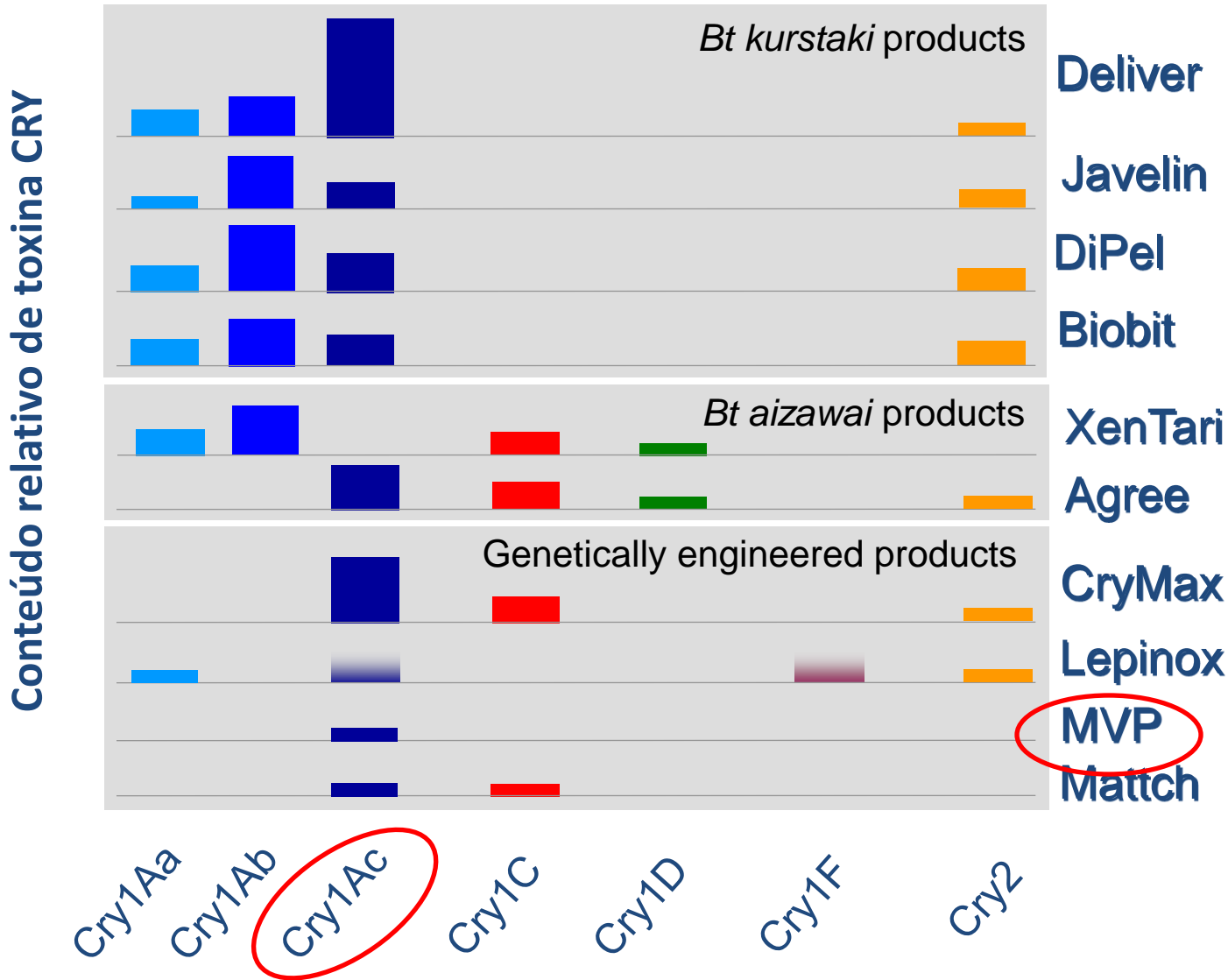


Mode d'action de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*

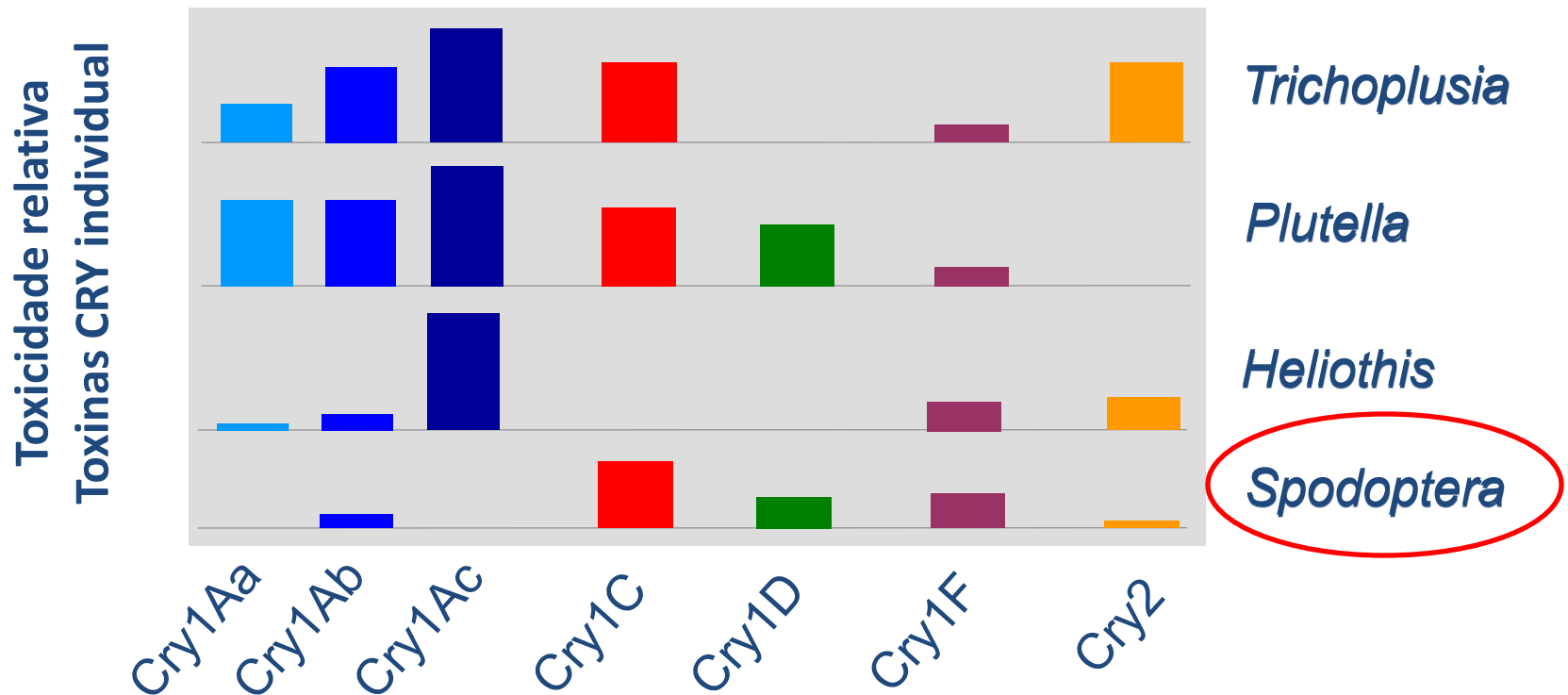


Comment agit la toxine de Bt

Profils d'endotoxines dans les produits *Bt* utilisés contre les Lépidoptères



Toxicité des δ -endotoxines de *Bacillus thuringiensis* vis à vis des Lépidoptères importants



Quels types de cotonniers 'Bt' ?

Toxine	Insectes-cibles	Nom commercial
Cry1Ac (1996)	<i>Helicoverpa</i> spp. / <i>Heliothis virescens</i> <i>Pectinophora gossypiella</i> , <i>Alabama argillacea</i> , <i>Earias</i> spp.	Bollgard [®] , Ingard [®] (Monsanto)
Cry1Ac + Cry2Ab2 (2003)	<i>Helicoverpa</i> spp. / <i>Heliothis virescens</i> <i>Pectinophora gossypiella</i> , <i>A.argillacea</i> + <i>Spodoptera</i> spp.	Bollgard II [®] (Monsanto)
Cry1Ac + Cry1Fa2 (2005)	<i>Helicoverpa</i> spp. / <i>Heliothis virescens</i> <i>Pectinophora gossypiella</i> , <i>A.argillacea</i> + <i>Spodoptera</i> spp.	WideStrike [®] (DowAgrosciences)
Vip3A* (200..?)	<i>Helicoverpa</i> spp. / <i>Heliothis virescens</i> <i>Pectinophora gossypiella</i> <i>Spodoptera</i> spp., <i>Agrotis ipsilon</i> , ...	VipCot [®] (Syngenta)

Bollgard III en préparation

Cry1Ac
Cry2Ab2

COT102 (Syngenta) (Vip3Aa19)

TwinLink™

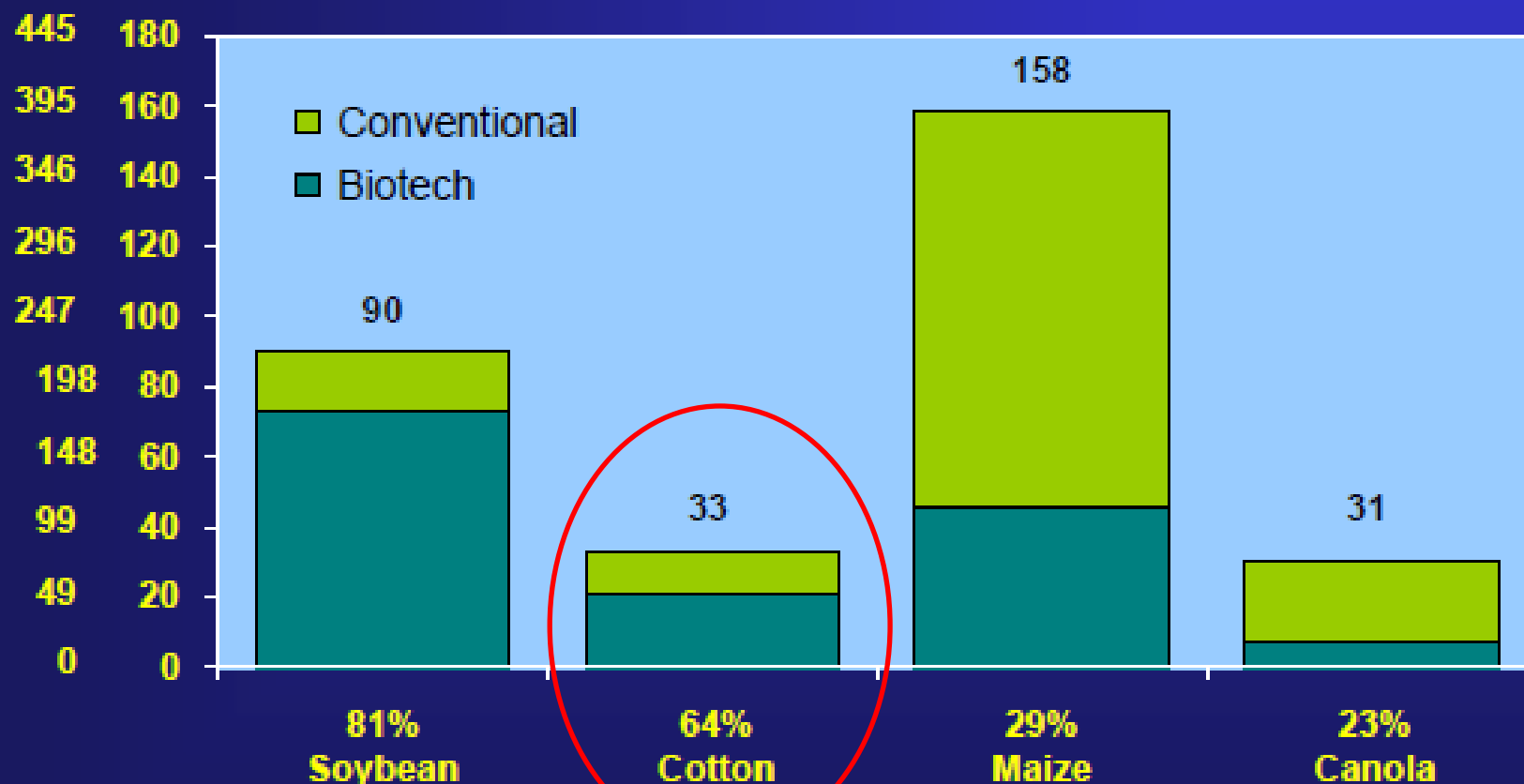
Cry1Ab
Cry2Ae

« Sous certaines conditions, y compris la pression extrême des lépidoptères (Greene et al. 2011), un contrôle supplémentaire des lépidoptères peut s'avérer nécessaire pour renforcer l'efficacité.. »



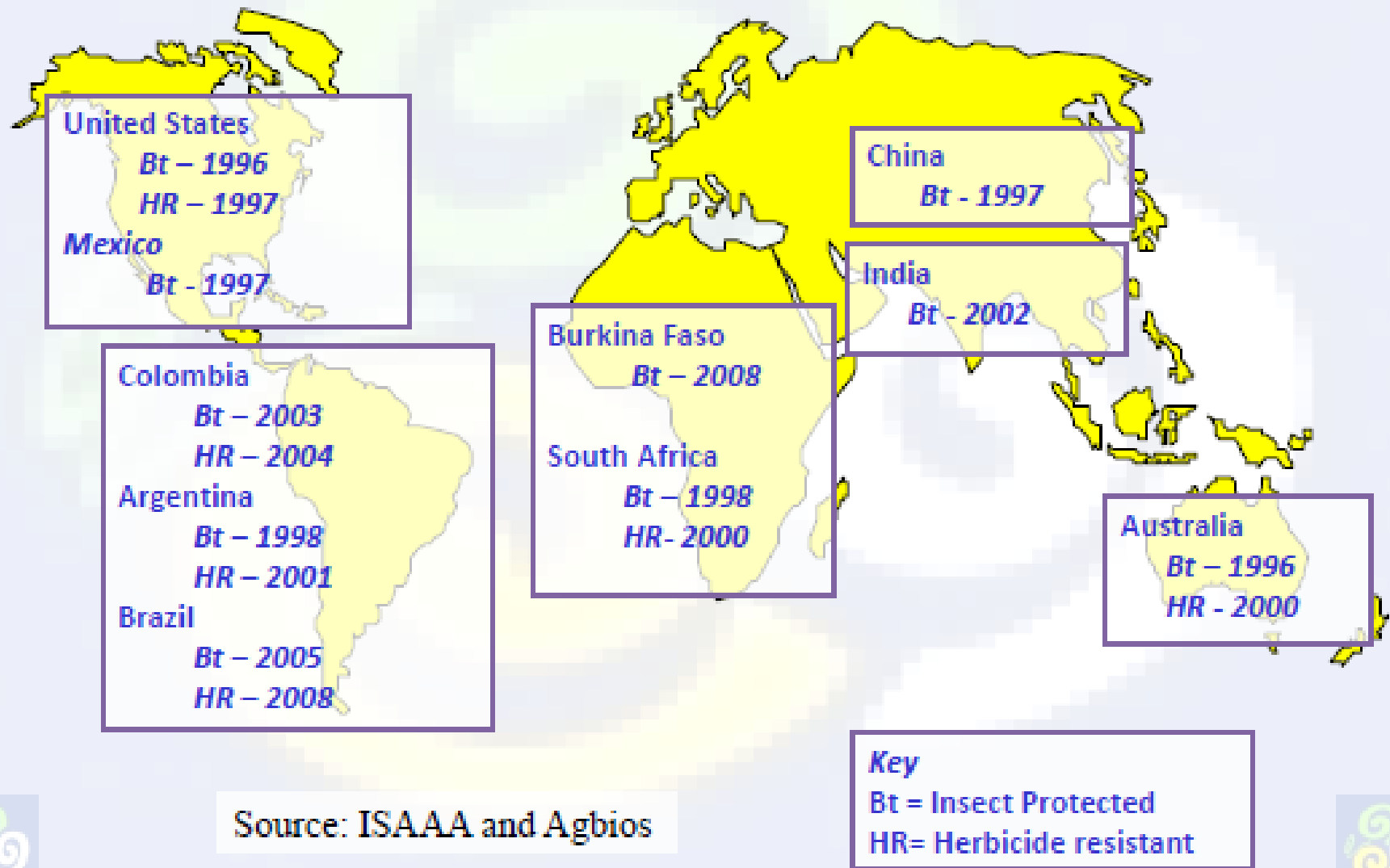
Global Adoption Rates (%) for Principal Biotech Crops (Million Hectares, Million Acres), 2010

M Acres

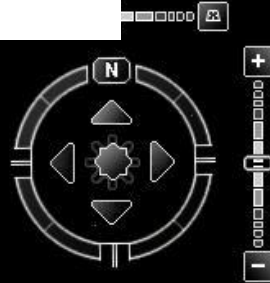
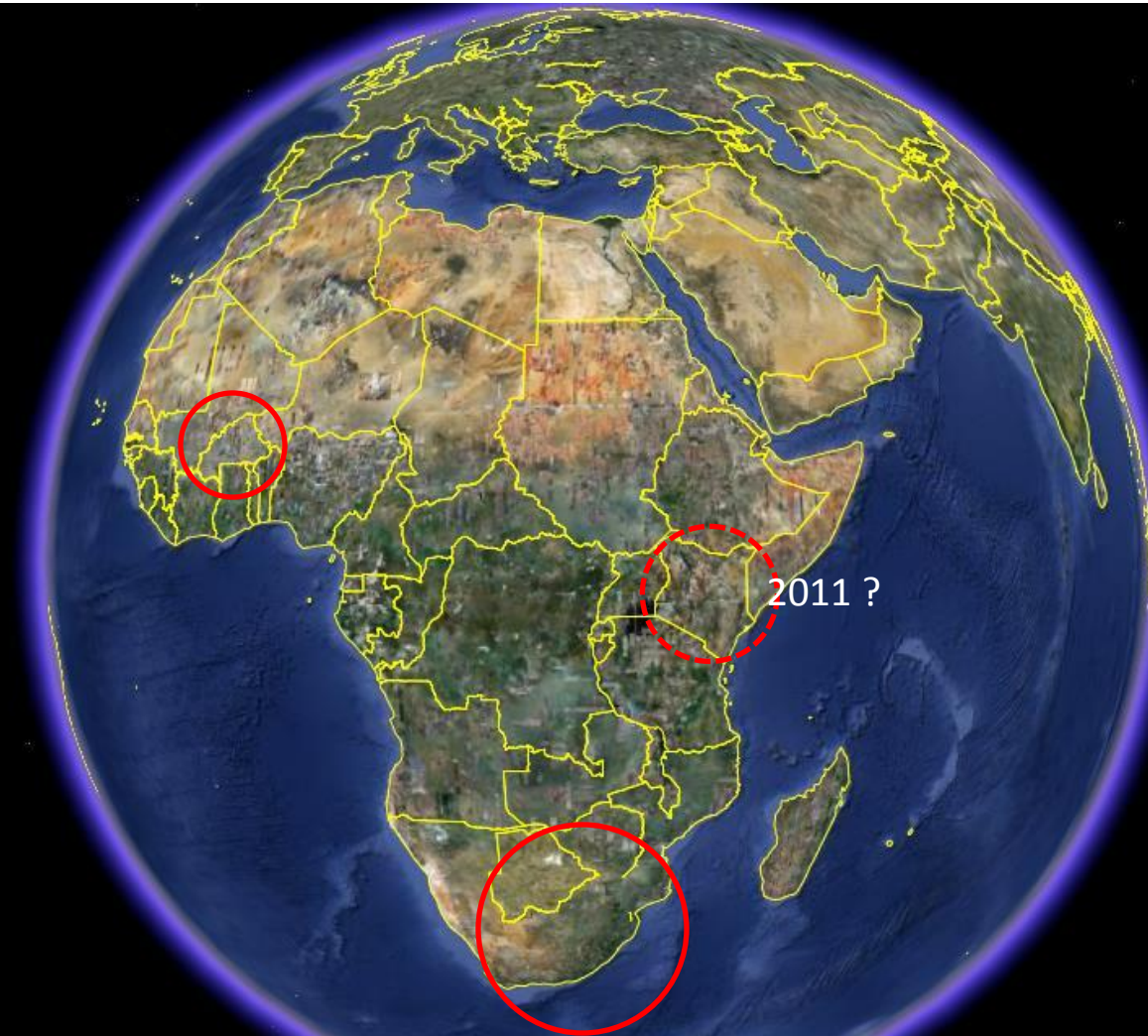


Source: Clive James, 2010

Global Adoption of Biotechnology Traits in Cotton



La situation des cotonniers Bt en Afrique



Data SIO, NOAA, U.S. Navy, NGA, GEBCO
© 2010 Tele Atlas
US Dept of State Geographer
© 2010 Europa Technologies

©2007 Google™

Pointeur 3°18'18.39" N 29°42'12.48" E élév. 3269 ft

Mise au point ||||| 100%

Altitude 8539.65 mi

Les questions posées par l'usage des cotons Bt

Efficacité et intérêt économique

1 Efficace ? Expression du gène...

2 Intéressant (réduction d'insecticide) ?

3 Économiquement intéressant

***pour les petits planteurs ?**

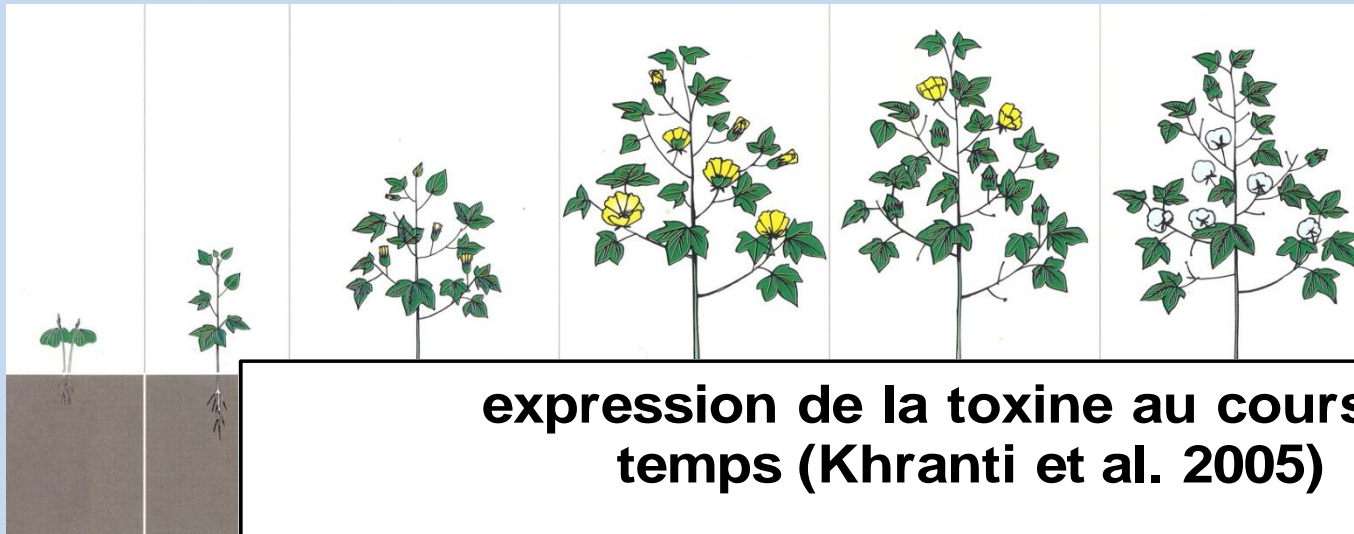
***pour les grands exploitants ?**

Efficacité

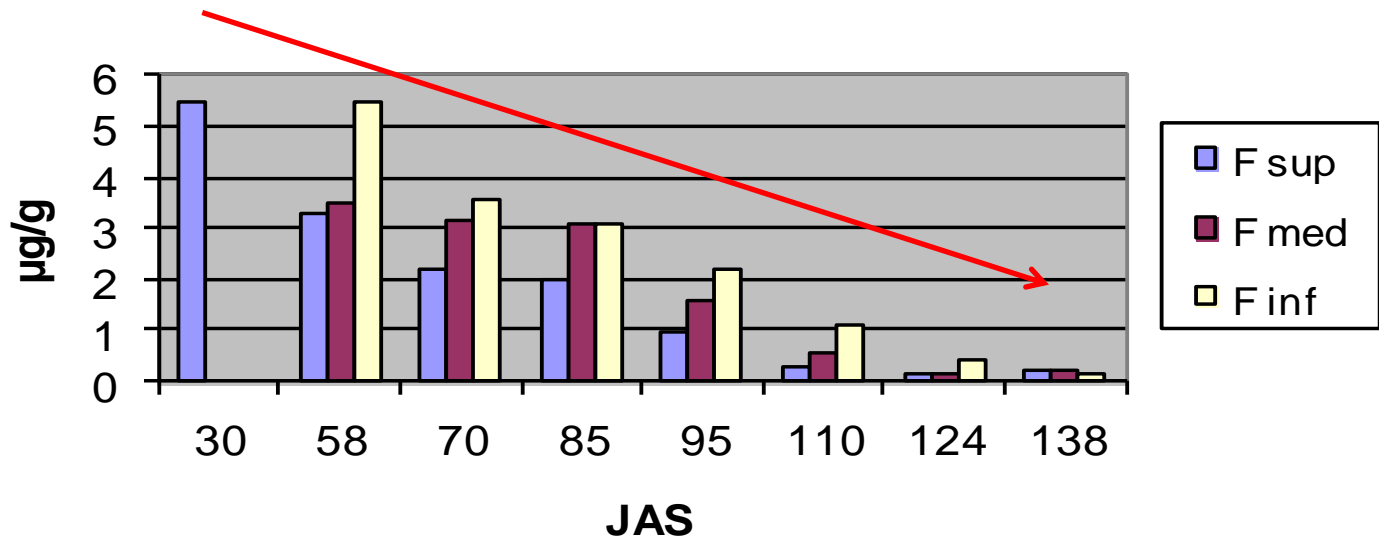


Source: Vaughn, Congrès Coton Brésil, 16-09-2009

Expression dans les divers tissus de la plante



expression de la toxine au cours du temps (Khranti et al. 2005)



Kranthi, K.R., S. Naidu, C.S. Dhawad, A. Tatwawadi, K. Mate, E. Patil, A.A. Bharose, G.T. Behere, R.M. Wadaskar, and S. Kranthi. 2005. Temporal and intra-plant variability of Cry1A expression in Bt cotton and its influence on the survival of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* Hübner (Noctuidae: Lepidoptera). *Curr. Sci.* 89:291-298.

Expression dans les divers tissus de la plante

In-season changes in Cry1Ac expression ($\mu\text{g/g}$ fresh weight) in the upper canopy leaves of Bt-cotton hybrids –2003

Bt Bollgard® hybrids																	
DAS	RCH-2		RCH-20		RCH-134		RCH-138		RCH-144		MECH-12		MECH-162		MECH-184		LSD
30	5.15	±	6.61	±	4.67	±	4.42	±	5.56	±	6.20	±	4.97	±	6.47	±	1.37
		0.9abc		± 1.1d		0.7a		0.3a		0.5abcd		1.0ab		0.7bcd		1.6cd	
58	3.43	±	3.60	±	2.33	±	3.91	±	2.96	±	4.05	±	2.68	±	3.57	±	0.64
		0.3bc		0.3bc		0.4a		0.4c		± 0.5ab		0.4c		± 0.5a		0.6bc	
70	2.23	±	1.94	±	1.26	±	2.91	±	1.87	±	3.32	±	1.35	±	2.51	±	0.94
		0.9bcd		0.8abc		0.5a		0.5de		0.2abc		0.8e		0.6ab		0.5cde	
85	1.46	± 0.8	2.40	± 1.1	1.53	± 0.9	2.62	± 1.2	1.63	± 0.3	2.31	± 1.2	1.16	± 0.3	2.60	± 0.8	NS
95	0.58	± 0.9	0.77	± 0.5	1.66	± 0.1	0.97	± 1.2	1.11	± 1.0	1.07	± 0.4	0.55	± 0.4	0.89	± 0.7	NS
110	0.21	±	0.41	±	0.22	±	0.14	±	0.44	±	0.38	±	0.16	±	0.47	±	0.21
		0.1ab		0.2bc		0.1ab		0.1a		± 0.2c		0.2bc		± 0.1a		± 0.2c	
124	0.09	± 0.1	0.03	± 0.0	0.07	± 0.1	0.15	± 0.1	0.13	± 0.2	0.32	± 0.3	0.02	± 0.0	0.26	± 0.2	NS
138	0.02	±	0.01	±	0.01	±	0.42	±	0.49	±	0.21	±	0.01	±	0.71	±	0.20
		± 0.0a		± 0.0a		0.0a		0.2b		± 0.3b		0.1a		± 0.0a		± 0.1c	
148	0.01	+ 0.0	0.01	+ 0.0	0.10	+ 0.2	0.03	+ 0.0	0.02	+ 0.0	0.08	+ 0.0	0.01	+ 0.0	0.12	+ 0.1	NS

Abbreviations: DAS = Days after sowing; LSD = Least Significant Difference.

Numbers followed by different letters within a row are significantly different at $P = >0.05$.

Inde

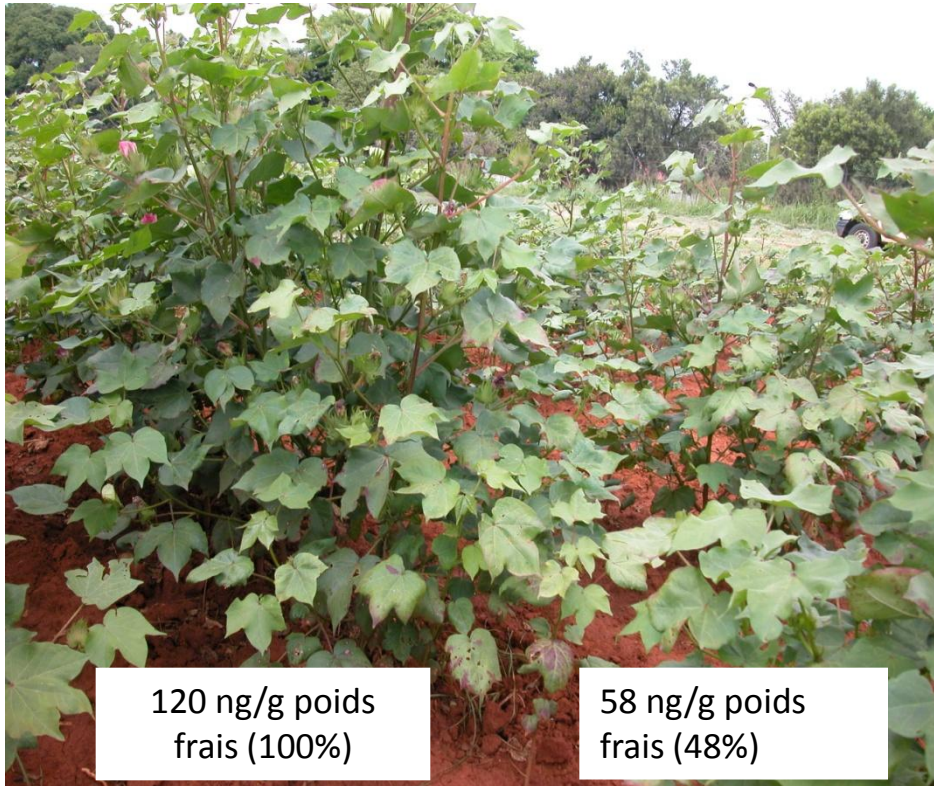
(Source: Kranthi & Russell, 2005)

Effet de la température

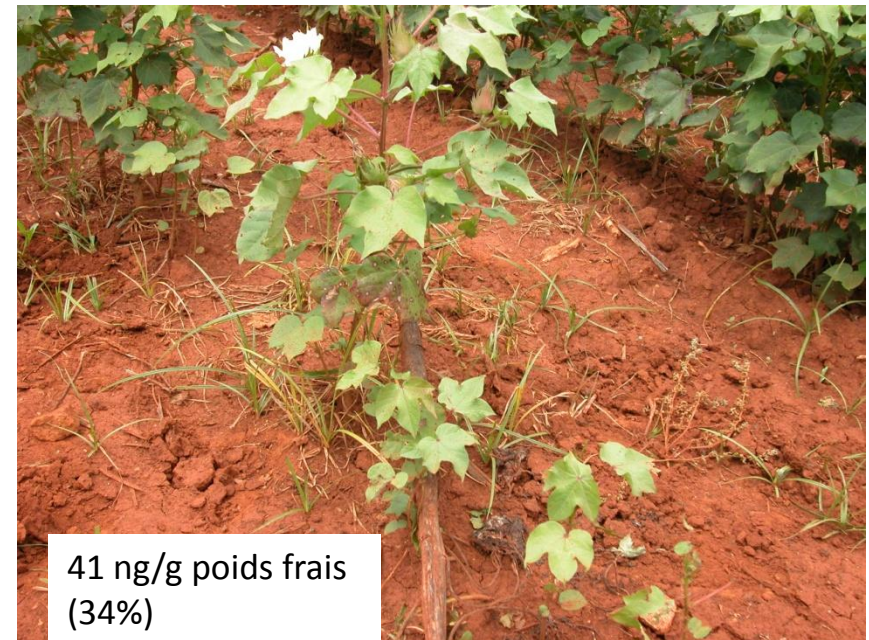
Chen D., Ye G., Yang C., Chen Y., Wu Y. (2005). The effect of high temperature on the insecticidal properties of Bt Cotton. *Environmental and Experimental Botany* 53 (3), p. 333- 342.

« l'exposition à des températures supérieures à 37°C pendant une période de 24 heures réduisait de plus de 50% les concentrations en protéines Cry1A. »

Vérification de l'expression de la toxine au champ



Grande variation entre plantes



Plus faible expression dans des plantes en stress hydrique

< 350 kg/ha

La variété seule ne suffit pas



Coton Bt (Makhathini): avec un faible management

3500 Kg/ ha

La variété seule ne suffit pas




Champ de coton Bt (region de Pongola)

Réduction du nombre de traitements insecticides : exemple de l'Australie

Type de Coton & Nb d'interventions	% <i>H. armigera</i>	% Piqueurs (Mirides, Pucerons, Pentatomides, etc...)	% Autres
Traditionnel 11.4	93	5	2
Coton Bt 3.0	3	88	9

Lutte chimique à grande échelle

Brésil, Mato Grosso



	Campaign 2006-2007				Campaign 2007-2008	
	Acala 90	DP 90 B	NuOpal	DeltaOpal	DeltaOpal	NuOpal
Número de aplicações	17	19	15	14	27	26
Número total de produtos aplicados	30	24	18	22	41	36
Aplicações aficidas	9	13	5	5	5	5
Aplicações acaricidas	6	7	7	3	3	3
Aplicações moscas brancas	1	2	2	1	0	0
Aplicações lagartas	9 → 1	1	1 ← 8	10 → 6		
Aplicações bicudo	5	1	3	3	19	19
Aplicações percevejos	0	0	0	2	0	0

NuOpal, DP90B
(gène *cry1Ac*)

De 15 à 20 traitements, parfois plus, avec de nombreuses matières actives (insecticides, fongicides, herbicides, régulateurs de croissance)

Les questions posées par l'usage des cotons Bt

1 Efficace ? Expression du gène...

2 Intéressant (réduction d'insecticide) ?

3 Économiquement intéressant

***pour les petits planteurs ?**

***pour les grands exploitants ?**

Cela dépend...**taxe technologique**

Autres questions posées

Risques et impacts sur l'environnement

1 Flux de gènes des transgenes (herbicides, en particulier) ?

2 Transfert horizontal (aux bactéries du sol) ?

3 Effets sur les Arthropodes non-cibles et les organismes aquatiques ?

4 Non efficacité au champ/Resistance des ravageurs-cibles à la ou aux toxines employées ?

Effet sur les diverses espèces de chenilles

Amérique	Afrique sub-Sah.
<i>Alabama argillacea</i> Bt (Cry1Ac)	<i>Syllepte derogata</i> Bt
<i>Pseudoplusia includens</i>	<i>Anomis flava</i>
<i>Spodoptera eridania</i>	<i>Spodoptera littoralis</i>
<i>Spodoptera frugiperda</i>	<i>Heliothis armigera</i> Bt
<i>Heliothis virescens</i> Bt	<i>Diparopsis watersi</i> Bt
<i>Helicoverpa zea</i>	<i>Cryptophlebia leucotreta</i>
<i>P. gossypiella</i> Bt	<i>P. gossypiella</i> Bt

La toxine **Cry1Ac** ne tue pas tous les ravageurs

Agallia albidula



Spodoptera spp.



Anthonomus grandis



*Pectinophora
gossypiella*



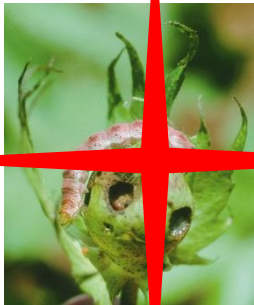
*Spodoptera
frugiperda*



Dégâts de
*Alabama
argillacea*



Bemisia tabaci



*Heliothis
virescens*



Alabama argillacea

Les toxines **Cry1Ac** et **Cry1F** ne tuent pas tous les ravageurs

Agallia albidula



Spodoptera spp.



Anthonomus grandis



*Pectinophora
gossypiella*



*Heliothis
virescens*



*Spodoptera
frugiperda*



Dégâts de
*Alabama
argillacea*



Bemisia tabaci



Alabama argillacea

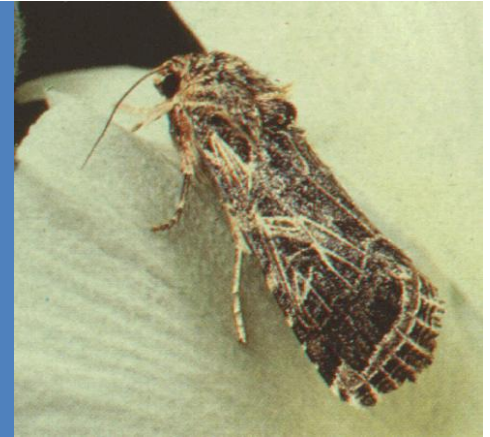
Avec le cotonnier Bt (**Cry1Ac**)

Nouveaux ravageurs signalés

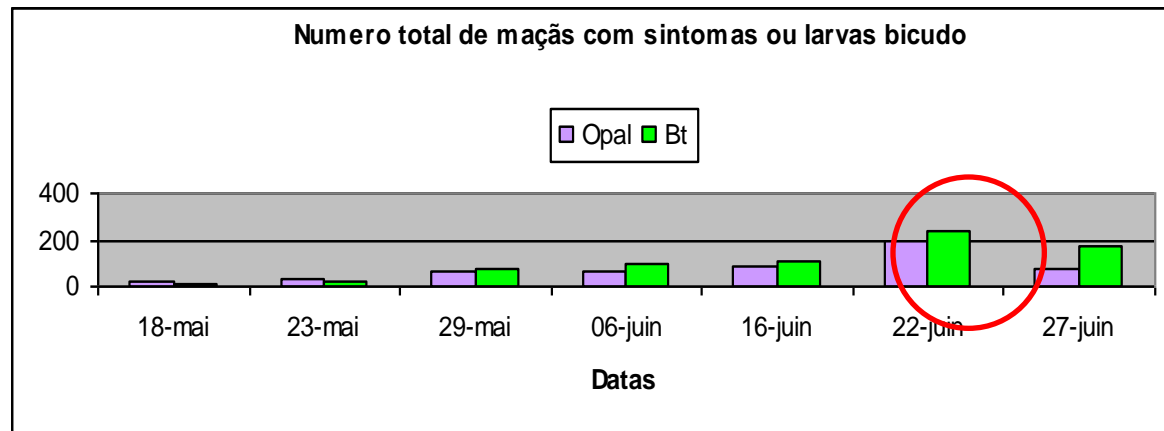
Chenilles

Spodoptera litura (Chine, Asie, Australie)

Spodoptera eridania, *Pseudoplusia includens*
(Brésil)



Anthonomus grandis n'est pas tué par Cry1Ac

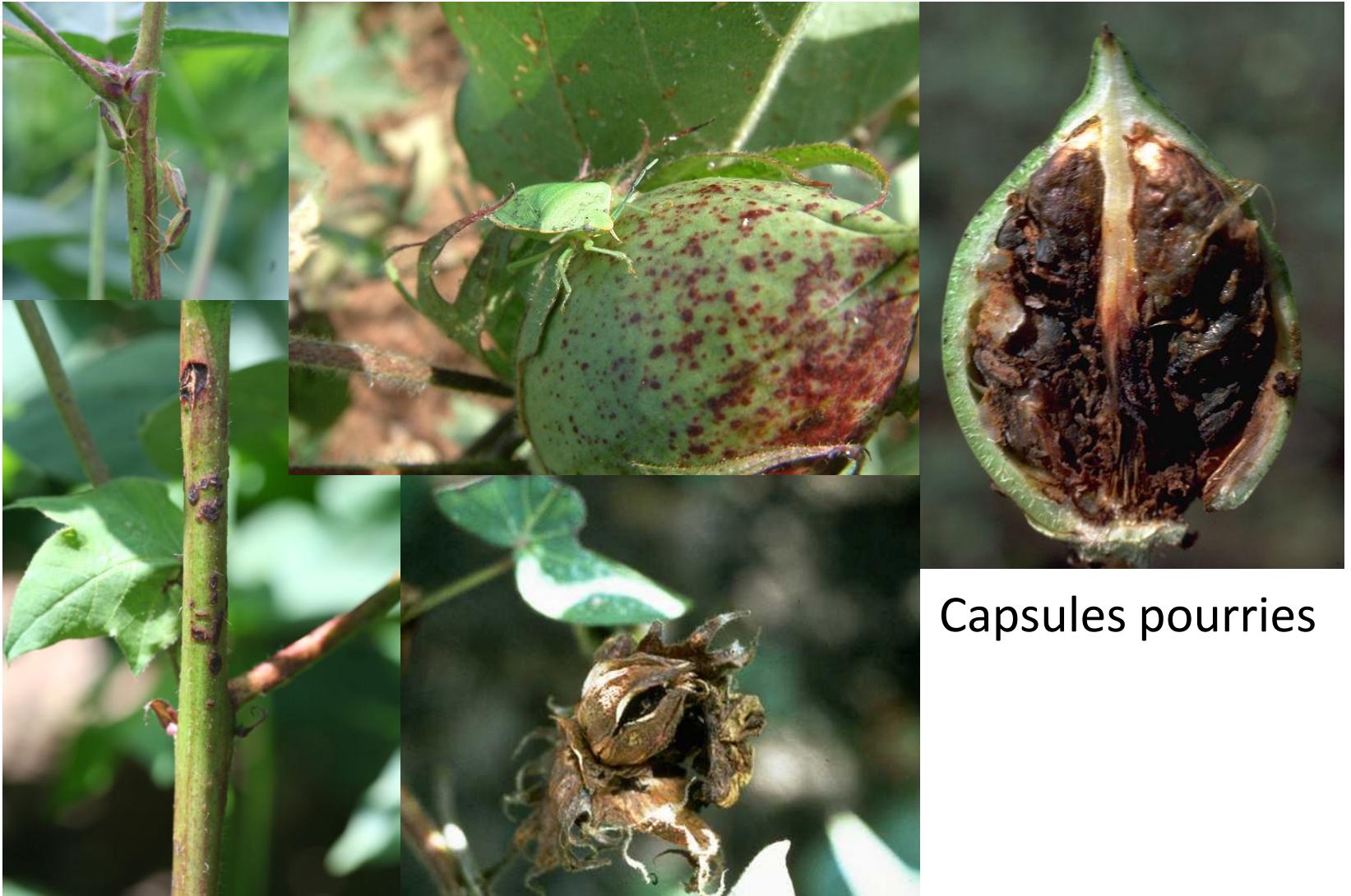


Présence dans capsules vertes au Brésil

Présence de Miridae et d'autres punaises...



Dégâts de punaises



Capsules pourries

Capsules momifiées

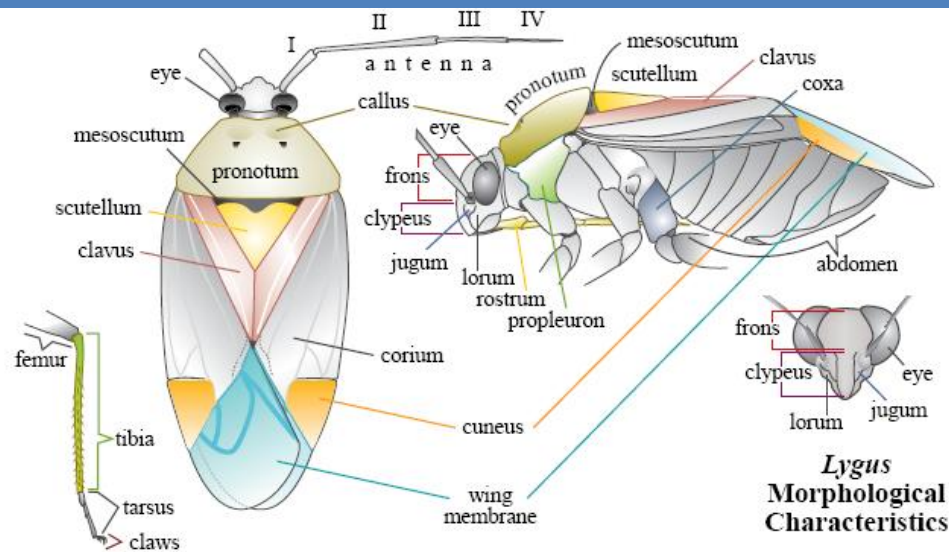
Nouveaux ravageurs signalés

Punaises

Australie: Miridae (*Creontiades dilutus*), Pentatomidae (*Nezara viridula*)

Chine: Miridae (*Lygus lucorum*, *Adelphocoris fasciaticollis*, *A. lineolatus*)

USA: Miridae (*Lygus lineolaris*, *Lygus hesperus*, *Lygus elisus*)
Pentatomidae (*Euschistus servus*, *Nezara viridula*, *Acrosternum hilare*)



Les recherches permettent de mieux connaître les visiteurs de fleurs (dont les pollinisateurs)

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 148

(EMBRAPA, Carmen Pires *et al.*, 2006)



Foto 1: Algumas espécies de abelhas coletadas em flores de algodoeiro no Distrito Federal na floração de 2003 preparadas para identificação entomológica.

Autres questions posées

Risques et impacts sur l'environnement

1 Flux de gènes des transgenes (herbicides, en particulier) ?

2 Transfert horizontal (aux bactéries du sol) ?

3 Effets sur les Arthropodes non-cibles et les organismes aquatiques ?

4 Non efficacité au champ/Résistance des ravageurs-cibles à la ou aux toxines employées ?

Comment mesurer la résistance ?

Les méthodes de l'écoxotologie
sont employées

Essais biologiques (= bioessais) au laboratoire

Bioessai avec une Toxine

On utilise le même principe qu'avec les insecticides:
détermination de **Concentrations Létales 50** (CL 50)

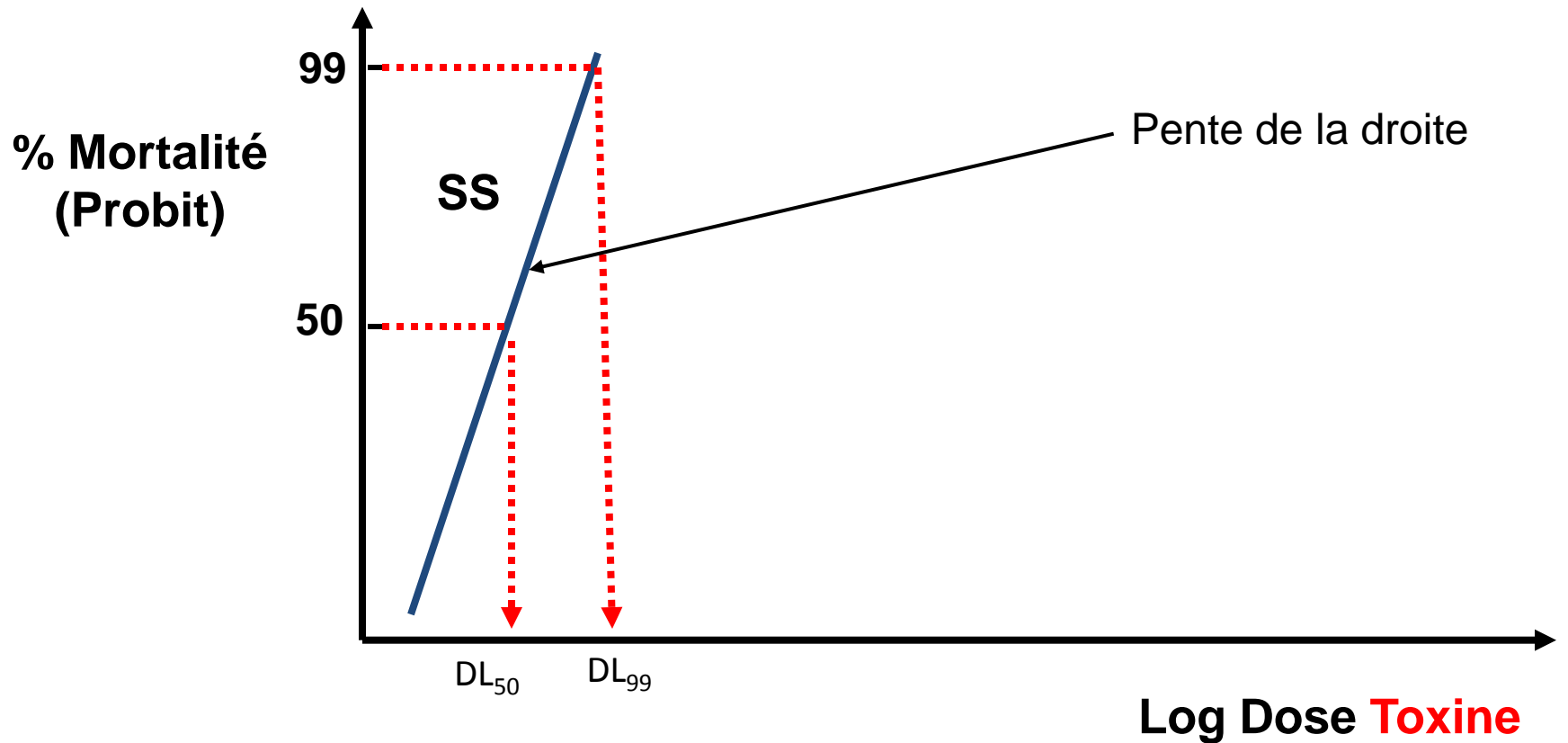
On établit une courbe de réponse

Concentration (toxique) - Mortalité

Deux types:

- Bioessai avec une **toxine purifiée** (dilutions en série de la toxine applique à la surface d'une plante ou d'un milieu artificiel)
- Bioessai avec des dilutions en série de **tissus lyophilisés de plante Bt** mélangé au milieu artificiel (le tissu d'une plante non-Bt sert de témoin)

Cas d'ingestion de toxine

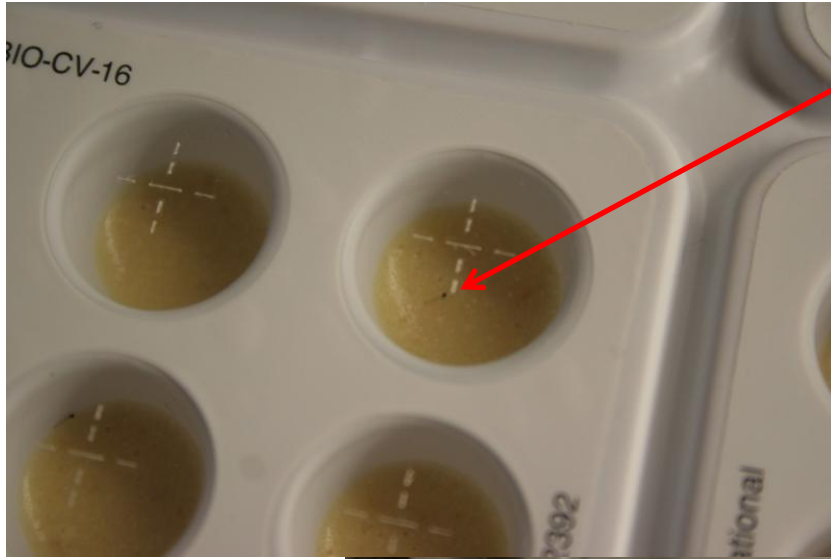


CL 50 exprimée en micro ou ng **toxine /ml ou cm²** (de milieu)

Bioessai avec une Toxine purifiée



Bioessai avec une Toxine purifiée



Exemples de CL 50 (ppm)

Bioessais avec deux toxines

Espèce	Cry1Ac	Cry2Ab
<i>P.gossypiella</i>	0.006	0.1
<i>H.zea</i>	1.56	15.26
<i>H.virescens</i>	0.035	0.62
<i>S.frugiperda</i>	> 100	47.5
<i>S.exigua</i>	> 100	19.4

(Source: documentation EPA, EU)

Exemple de schématisation (cas de *Plutella xylostella*)

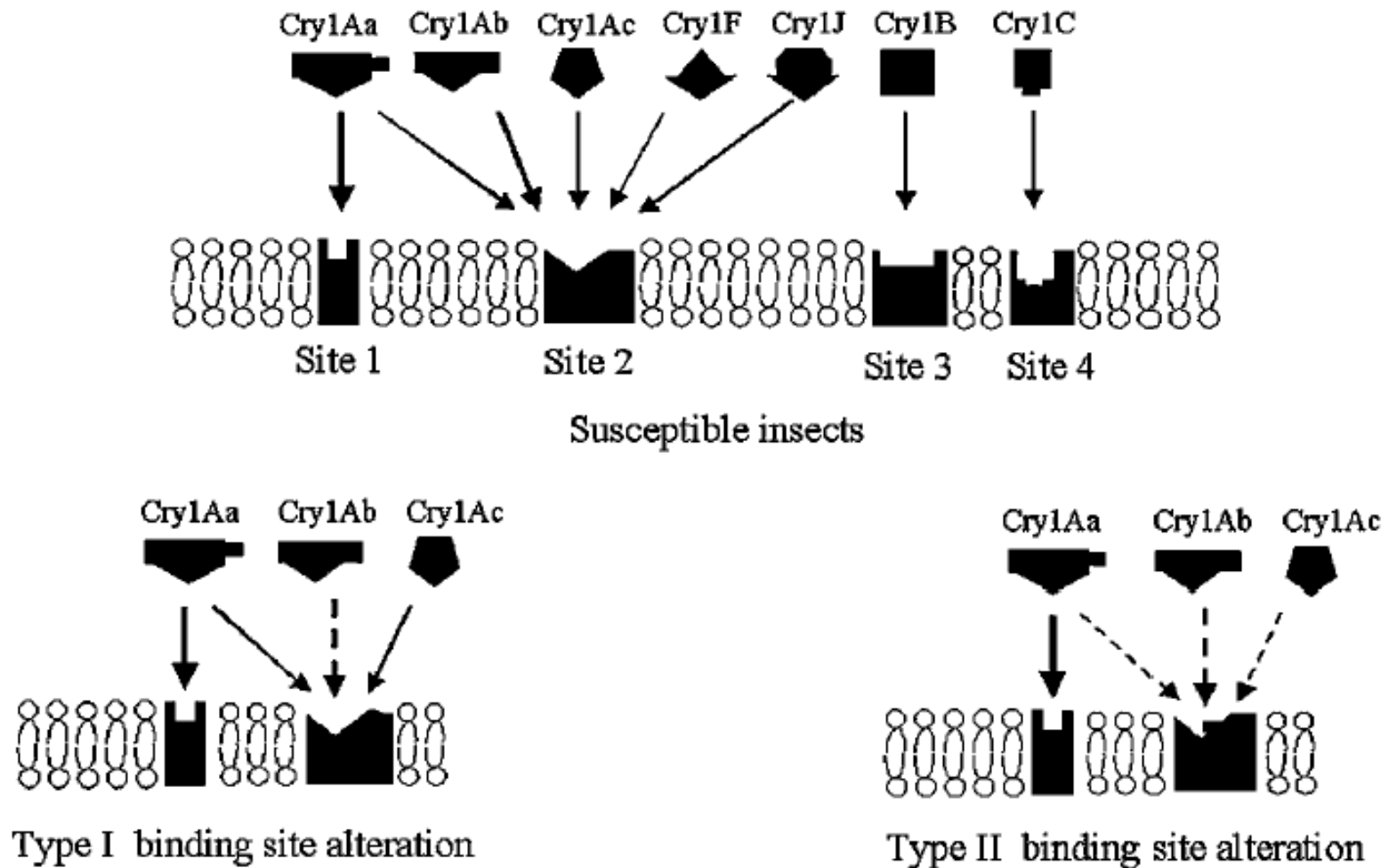


Figure 1 Proposed model for binding of *Bt* Cry proteins to the brush border membrane of midgut cells of *P. xylostella* larvae.

Mais attention !! précautions

Répétitivité de la méthode

- * Nécessité de toxine purifiée, même lot (Exemple, Espagne, Madrid)

Influence possible des conditions expérimentales

- *Milieu d'élevage

Ref. Gunning RV & Moores GD. 2010. The effects of diet on the detection of resistance to cry1ac toxin in australian *Helicoverpa armigera* Hübner (lepidoptera: Noctuidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 97, 55-59.

“Resistant neonate larvae reared on denatured soybean flour diet showed resistance factors of 7980 and 16,901 at the LC50 and LC99 levels, respectively. By comparison, resistance could not be detected in neonate larvae reared on raw flour diet.”

Comment gérer (retarder) la résistance ?

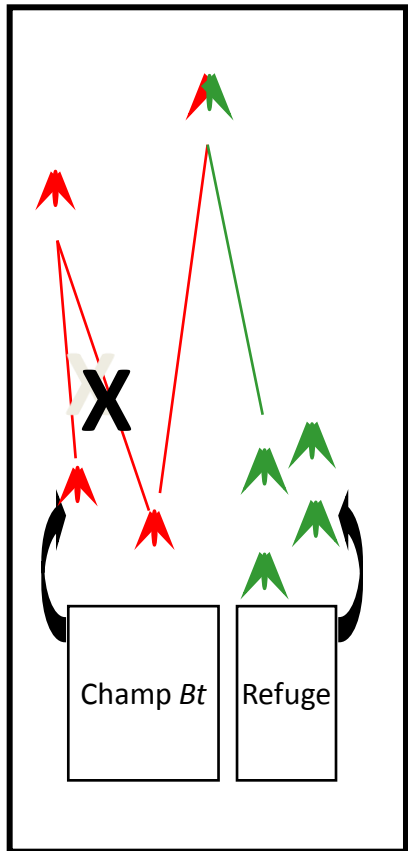
La stratégie “Haute Dose- Refuge” (HDR) a été recommandée dès le début pour gérer la résistance attendue des ravageurs-cibles aux toxines de *Bt*

- Tuer les individus hétérozygotes RS
- Favoriser une “dilution” des gènes de résistance

Le succès de cette stratégie dépend de considérations théoriques:

1. Du caractère « récessif » du gène qui confère la résistance
2. De la fréquence initiale des allèles de resistance aux toxines (doit être faible)
3. D'une bonne mobilité des adultes dans la zone des plants transformés (toxiques)- faciliter les croisements
4. De l'accouplement au hasard entre les adultes

Stratégie HDR



Une stratégie pragmatique

-prenant en compte “l’état de l’art” (gènes, promoteurs et plantes transgéniques disponibles, connaissances et capacités techniques disponibles)

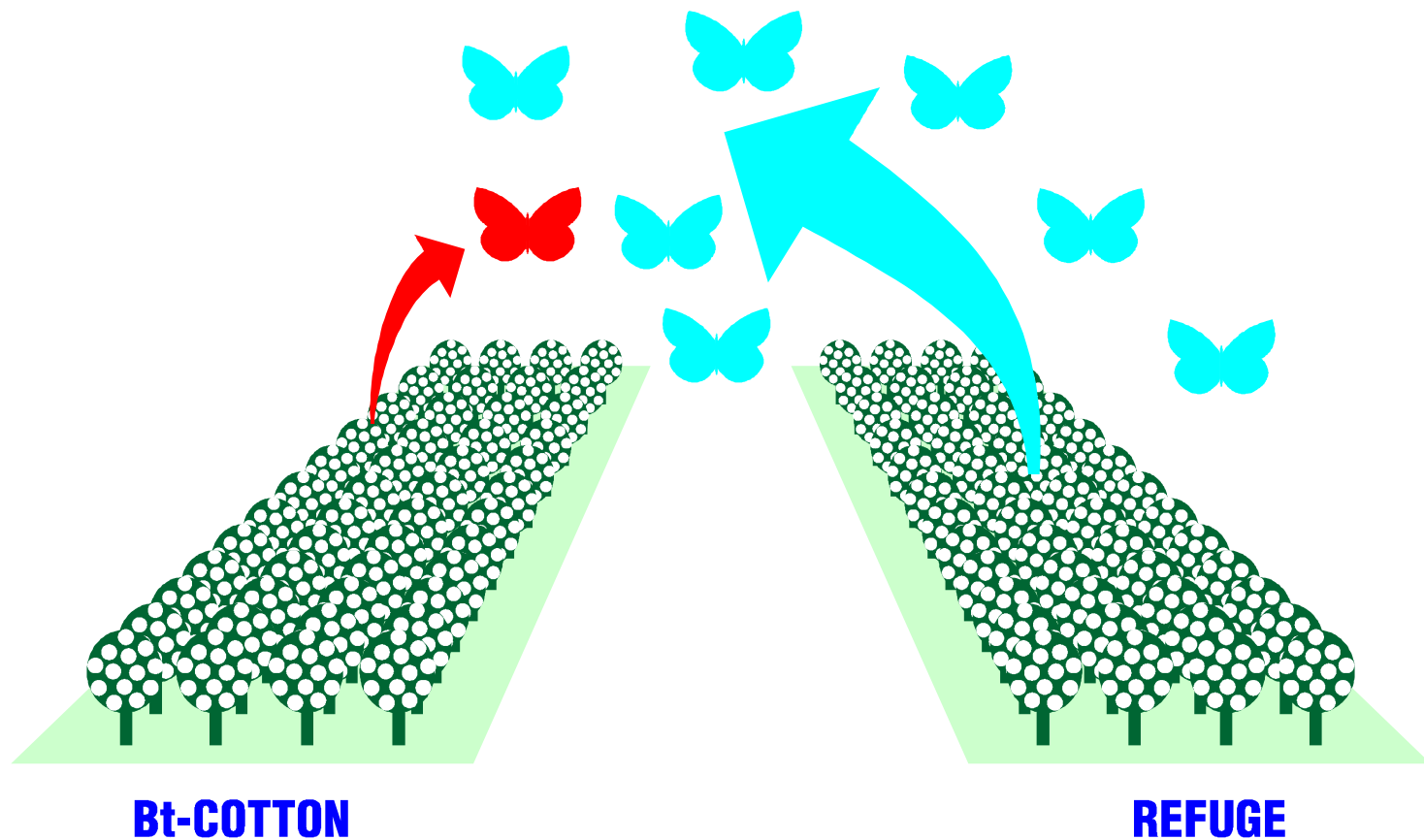
- basée sur des modèles utilisant des hypothèses non vérifiées (manque de données réelles):

- * allèles de R rares ($<10^{-6}$)
- * R fonctionnellement récessive
- * haute dose (25 X CL_{50} , mortalité SS $>99\%$)

Pour d’autres CL99

Pour d’autres 10^{-3}

Principe du refuge dans le cas du cotonnier



Définition de “haute” et “basse” doses

Haute dose: la concentration (de toxine) qui permet de tuer les individus hétérozygotes RS avec quasiment le même taux que les homozygotes SS

Dose basse: toute concentration qui n'est pas une haute dose

Définition de US-EPA (opérationnelle)

“haute dose” est une plante qui exprime la toxine a une concentration qui est équivalente a 25 fois la valeur de la CL 99 déterminée pour un ravageur-cible donné.

Stratégie HDR

Qu'est-ce qu'un "Refuge" ?

"Refuge" = espoir de croisements entre individus sensibles et résistants

Exemples de refuges en Australie



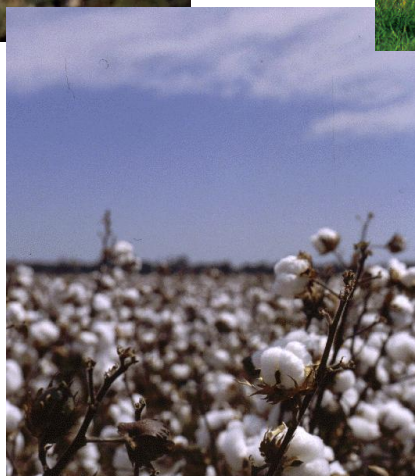
Coton traité 100 ha



Maïs 20 ha



Cajanus cajan 5 ha



Coton non traité
10 ha



Sorgho 15 ha

Stratégie de gestion de la résistance aux toxines de *Bt*

Les recommandations actuelles

- 5 % aire cultivée avec variété conventionnelle (non-Bt) non traité chimiquement
- 20 % aire avec variété conventionnelle traitée mais pas avec des biopesticides à base de Bt
- 5 % aire avec variété conventionnelle traitée mais pas avec des biopesticides à base de Bt (cas de Bollgard II)

Situation actuelle de la résistance aux toxines de *Bt*

En conditions naturelles

Ref.: Success of the high-dose/refuge resistance management strategy after 15 years of Bt crop use in North America

Huang et al., 2011

Entomologia Experimentalis et Applicata 140: 1–16, 2011

3 cas signalés dont un sur le cotonnier

Pectinophora gossypiella, en Inde (**Cry1Ac**)

Bagla (2010) Science



Situation actuelle de la résistance aux toxines de *Bt*



Spodoptera frugiperda à Porto Rico
(sur maïs Bt, **Cry1F**)

(Ref. : Storer *et al.*, 2010,
J.Econ.Ent.103:1031-1038)



Busseola fusca (African stem borer)
sur maïs Bt (**Cry1Ab**) en Afrique du Sud

(Ref.: van Rensburg 2007,
S.Afr.J.Plant Soil 24:147)



Sur cottonnier (cas suspectés)

« Suspected field resistance

Field resistance to Bt crops has been suggested in two additional cases, *H. zea* to **Cry1Ac** cotton in southcentral **USA** (Tabashnik et al., 2008, 2009), and *H. armigera* to **Cry1Ac** cotton in **China** (Liu et al., 2010).

Ref.: Success of the high-dose/refuge resistance management strategy after 15 years of Bt crop use in North America

Huang et al., 2011

Entomologia Experimentalis et Applicata 140: 1–16, 2011

Polémiques entre chercheurs américains

Insect resistance to *Bt* crops: evidence versus theory

Bruce E Tabashnik¹, Aaron J Gassmann^{1,2}, David W Crowder¹ & Yves Carrière¹

NATURE BIOTECHNOLOGY VOLUME 26 NUMBER 2 FEBRUARY 2008

Les auteurs ré analysent les données publiées (obtenues par d'autres auteurs) et concluent que *Helicoverpa zea* a développé une résistance au coton Bt aux Etats-Unis

Field-evolved resistance to *Bt* toxin

William Moar¹, Rick Roush², Anthony Shelton³,
Juan Ferré⁴, Susan MacIntosh⁵,
B. Rogers Leonard⁶ & Craig Abel⁷

VOLUME 26 NUMBER 10 OCTOBER 2008 NATURE BIOTECHNOLOGY



Contestent les conclusions de l'article antérieur. Pour eux, il n'y a pas d'évidence solide pour dire que *H. zea* est devenu résistant au coton Bt

État des lieux pour la résistance aux toxines de *Bt*

Table 3 Summary of the application of the three fundamental requirements of the ‘high-dose/refuge’ strategy to Cry1Ab maize and Cry1Ac cotton in the USA, and Bt crops and localities with documented (grey boxes) or suspected (light grey boxes) field resistance

Bt crop and locality	Pest	Recessive resistance (high dose) ¹	Resistance allele <0.001 ²	Refuge ¹
Cry1Ab maize in USA	<i>Ostrinia nubilalis</i>	+	<0.0004	+
Cry1Ab maize in USA	<i>Diatraea grandiosella</i>	+	<0.0035	+
Cry1Ab maize in South Africa	<i>Busseola fusca</i>	–	?	–
Cry1F maize in Puerto Rico	<i>Spodoptera frugiperda</i>	–	?	–?
Cry1Ac cotton in USA	<i>Heliothis virescens</i>	+	0.0004	+
Cry1Ac cotton in USA	<i>Pectinophora gossypiella</i>	+	<0.0003	+
Cry1Ac cotton in USA	<i>Helicoverpa zea</i>	–	?	+
Cry1Ac cotton in India	<i>P. gossypiella</i>	+	?	–?
Cry1Ac cotton in China	<i>Helicoverpa armigera</i>	+/-	?	–?

¹‘+’ = meets the requirement of the ‘high-dose/refuge’ IRM strategy; ‘–’ = does not meet the requirement; ‘+/-’ = meets the requirement in the vegetative plant stages but not for the reproductive stages; ‘?’ = information is unavailable.

²Bt resistance allele frequencies are based on Bourguet et al. (2003) for *O. nubilalis*, Huang et al. (2007a) for *D. grandiosella*, Blanco et al. (2009) for *H. virescens*, and Tabashnik et al. (2006) for *P. gossypiella*. Inequalities provide upper range of the 95% credibility interval for *O. nubilalis* and *D. grandiosella*, and a 95% confidence interval for *P. gossypiella*. The value for *H. virescens* is an expected frequency.

Le cas de *H. punctigera* en Australie

Characteristics of Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry2Ab in a Strain of *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae) Isolated from a Field Population

Author(s): S. Downes, T. L. Parker, and R. J. Mahon

Source: Journal of Economic Entomology, 103(6):2147-2154. 2010.

Cry2Ab

Incipient Resistance of *Helicoverpa punctigera* to the Cry2Ab Bt Toxin in Bollgard II® Cotton

Sharon Downes^{1*}, Tracey Parker¹, Rod Mahon²

D'autres effets pas prévus au programme

- Les plantes transgéniques deviennent des 'mauvaises herbes'
- La question de la co-existence des filières (mélange de semences)

Exemple: tolérance aux herbicides

Le gène de tolérance
aux herbicides est
utilisé comme gène
marqueur de la
transformation

Controlar tigueras em rotação de culturas



Le cotonnier Bt repousse
(plante-hôte des pucerons en
intersaison)

Source: W.J. dos Santos, congrès coton, Brésil, 2009

Autre risque: Mélange de semences

Situation au Paraguay

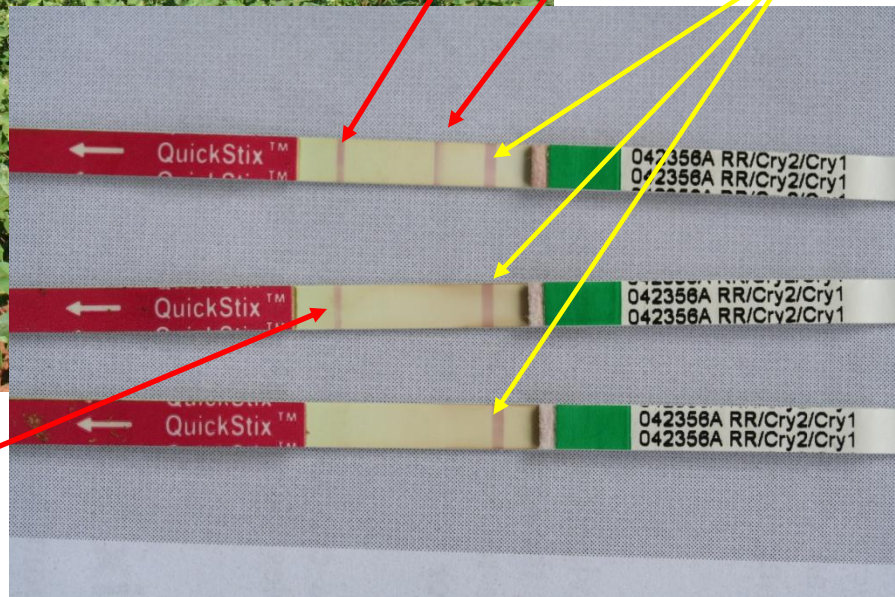


RR

RR

Cry1AC

Témoin



Conclusions

- * L'emploi de cotonniers Bt présente un intérêt dans certaines conditions à bien circonscrire (analyse cas par cas).
- * Un suivi post libération est indispensable (monitoring) pour apprécier (entre autres):
 - l'intérêt économique à long terme;
 - le complexe faunistique;
 - la résistance aux toxines.
- * Une vision holistique est nécessaire pour évaluer les risques et les impacts à différentes échelles (aspects réglementaires en plus des aspects scientifiques).

Avis EFSA (European Food Safety Authority) : Scientific Opinion on application EFSA-GMO-RX-MON531 for renewal of the authorization for continued marketing of existing **cottonseed oil, food additives, feed materials and feed additives produced from **MON 531 cotton** that were notified under Articles 8(1)(a), 8(1)(b) and 20(1)(b) of Regulation (EC) No 1829/2003 from Monsanto**

Sans oublier la déontologie...

Avis du comité d'éthique du Cirad sur les OGM végétaux (10 novembre 2005)

1. Il existe actuellement une demande très forte des pays du Sud sur les OGM : les partenaires du Sud adressent au CIRAD des demandes d'appui scientifique et juridique, notamment sur l'évaluation des risques. Le comité d'éthique estime donc que **le CIRAD ne peut pas se passer d'une expertise sur les OGM, et doit pour cela** acquérir des compétences, mener des recherches, participer aux débats de société, pour pouvoir répondre aux demandes de formation et de recherche des pays du Sud sur cette question.

Sans oublier la déontologie...

Avis du comité d'éthique du Cirad sur les OGM végétaux (10 novembre 2005)

4. Il n'existe pas de réponse générale sur la pertinence de développer des recherches sur les OGM. La pertinence des recherches sur les OGM est à examiner au cas pas cas, selon les pays, les contextes, et les plantes concernées (quelle est la pertinence de tel ou tel OGM dans une situation donnée, dans tel ou tel processus de développement ? quelle est son utilité sociale ? quels sont les risques ? dans quelle mesure est-ce un levier pour le développement ?...) La demande n'est pas la même selon les pays du Sud, ce qui implique de moduler les approches en fonction des situations écologiques et socio-économiques : on ne travaillera pas de la même façon sur les OGM avec le Brésil et avec le Burkina Faso (pour les pays les plus pauvres, se lancer dans des recherches concernant les OGM peut conduire à devenir encore plus dépendant, scientifiquement et commercialement, des pays développés. Le rôle du Cirad n'est-il pas alors de proposer des alternatives plus accessibles, permettant plus d'indépendance ?). **Le comité recommande que le CIRAD mobilise ses équipes de sciences sociales sur ces interrogations.**



Discussion